



**Diversité des espèces de levures dans des levains naturels français produits à partir de farine issue de l'Agriculture Biologique : une étude pilote pour analyser les pratiques boulangères et les patterns des communautés microbiennes**

Charlotte Urien

► **To cite this version:**

Charlotte Urien. Diversité des espèces de levures dans des levains naturels français produits à partir de farine issue de l'Agriculture Biologique : une étude pilote pour analyser les pratiques boulangères et les patterns des communautés microbiennes. Ecologie, Environnement. Université Paris Sud - Paris XI, 2015. Français. NNT : 2015PA112007 . tel-01249573

**HAL Id: tel-01249573**

**<https://theses.hal.science/tel-01249573>**

Submitted on 4 Jan 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE :  
Structure et Dynamique des Systèmes Vivants  
(anciennement ED 426 : Gènes, Génomes, Cellules)

Laboratoire : UMR de Génétique Quantitative et Evolution - Le Moulon

# THÈSE DE DOCTORAT

SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

par

**Charlotte URIEN**

Diversité des espèces de levures dans des levains naturels  
français produits à partir de farine issue de l'Agriculture  
Biologique : une étude pilote pour analyser les pratiques  
boulangères et les patterns des communautés microbiennes

**Date de soutenance : 23/01/2015**

### **Composition du jury :**

Directrice de thèse :	Delphine SICARD	Directrice de Recherche (INRA, Montpellier)
Co-encadrante de thèse :	Judith LEGRAND	Maître de Conférences (Université Paris-Sud, Orsay)
Rapporteurs :	Teun BOEKHOUT	Senior researcher (Fungal Biodiversity Centre, Pays-Bas)
	Joëlle DUPONT	Professeur (Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris)
Président du jury :	Olivier LESPINET	Professeur (Université Paris-Sud, Orsay)
Examineur :	Hubert CHIRON	Ingénieur d'Etudes (INRA, Nantes)



## Remerciements

Je tiens à remercier chaleureusement les membres de mon jury de thèse : merci aux rapporteurs Joëlle Dupont et Teun Boekhout d'avoir pris le temps de lire, d'évaluer et de commenter mon travail ; merci à Olivier Lespinet d'avoir accepté de faire partie de ce jury ; merci Hubert Chiron pour ta présence et les opportunités que tu m'as offertes au cours de cette thèse afin de valoriser mon travail ; enfin, je tiens à remercier Judith Legrand et Delphine Sicard qui ont co-encadré ce travail. Delphine, merci de m'avoir offert l'opportunité de faire un stage de Master 2 et découvrir le monde de la boulange ainsi que l'univers des levures, merci de m'avoir suffisamment fait confiance pour m'envoyer en mission à Stanford : ça a été une expérience professionnelle unique, et très enrichissante d'un point de vue personnel, merci de m'avoir encouragée à faire cette thèse, d'avoir eu confiance en moi, de m'avoir permis de faire un peu d'enseignement, merci également pour ton enthousiasme. Judith, merci d'avoir accepté de co-encadrer ce travail et d'y avoir apporté ton expertise de statisticienne. Merci à toutes les deux pour l'autonomie que vous m'avez permis d'acquérir durant ces années.

Merci à Dominique de Vienne de m'avoir accueilli au sein de l'ancienne UMR de Génétique Végétale du Moulon (rebaptisée aujourd'hui UMR Génétique Quantitative et Evolution – Le Moulon), et merci d'avoir permis au club gym de se réunir plusieurs fois par semaine au labo. Merci à la région Ile-de-France qui a financé cette thèse via un financement du DIM-Astréa.

Un grand MERCI aux boulangers et paysans-boulangers pour nous avoir ouvert leurs portes à Emilie et moi, pour nous avoir fait partager leur savoir et leur savoir-faire, pour nous avoir permis de mettre la main à la pâte (au sens propre comme au figuré)! Merci à Emilie Lhomme, ma camarade, mon "pendant bactéries lactiques": merci pour nos échanges, pour notre entre-aide, pour nos longues réunions téléphoniques. Merci aux stagiaires que j'ai pu encadrer et particulièrement à Candice Aulard pour tout le travail que tu as mené pendant tes 6 mois parmi nous. Merci aux membres de mon comité de thèse: Aymé Spor, Purification Lopez-Garcia, Pierre Capy, Emmanuelle Porcher, Philippe Roussel, Cécile Neuveglise et Laurence Bérard: pour votre écoute et vos remarques qui m'ont permis d'orienter mon projet vers son résultat final. Merci Mathieu Falque pour tes conseils notamment sur les PCR. Merci Aymé pour ton expertise et ton aide pour les analyses bioinfo. Merci Pierre Montalent pour le temps passé aux analyses NGS. Merci à Bernard Onno et Xavier Dousset pour notre collaboration dans le projet "dynamique des communautés microbiennes"! Merci à Serge Casaregola et Noémie Jacques du CIRM-levures pour votre expertise sur les marqueurs moléculaires et le travail en cours sur les souches de *Kazachstania* : le projet continue...



Ces années au Moulon ont été très riches. J'ai appris tout ce que je sais à la paillasse grâce à Xavier Raffoux, Carine Remoué, Aurélie Bourgaïs et Delphine : un grand merci pour cela! Xavier, merci de m'avoir présentée à tous au départ, merci pour ton soutien ces derniers mois. Carine, merci pour ton sourire permanent: tu es un rayon de soleil au labo! Merci aux autres personnes qui arpentent le labo (où il y a les paillasses) et notamment à Valérie : merci pour tes compliments sur mes tenues vestimentaires et tes attentions: ça m'a toujours fait chaud au cœur. Merci à l'ensemble de l'équipe GQF d'hier et BASE d'aujourd'hui. Merci Marie Ragon (ESE) de m'avoir initiée aux techniques de clonage. Merci Marion Richard pour l'accès à la centrifugeuse de l'IPB lorsque nous avons une panne au Moulon. Merci au Centre de Vulgarisation de la Connaissance de m'avoir intégrée pour 17 mois dans leurs projets et de m'avoir permis de me frotter aux hautes instances de l'administration française! Merci à Bruno Bost et l'Université Paris-sud pour m'avoir aidé dans ce long périple. Enfin, merci Maud Tenaillon d'avoir pris du temps pour lire mon travail et me rassurer à un moment critique.

Ces années au Moulon m'ont aussi permis de rencontrer des potes et des amis, plus chers à mon cœur qu'ils ne l'imaginent... Merci à ceux qui ont été particulièrement présents ces derniers mois, ceux qui ont été à la fois ou séparément mes piliers, mes refuges, mes soutiens sans faille, mes nourriciers, mes conseillers, mes épaules, mes éclaircis, mes distributeurs de rire et de bonne humeur, mes oasis dans le désert, mes relecteurs, ... : Yannick (merci pour les dizaines de fois où tu m'as laissé piloter ta clio d'homme sans enfant), Pierrot (merci de m'avoir encouragé dès le départ, merci pour tous tes conseils et nos longues journées à bosser sur les analyses de "Pierrot-séquençage", merci pour les ZC et pour tout ce que tu sais), Bub (merci de raser ta barbe !!!!!!!), Xavier (merci pour ta présence et ton investissement dans le travail d'équipe), Chris (merci d'avoir supporté mon visage et mes remarques « en tant que tel - en tant que tel - en tant que tel - en tant que tel !!! », merci pour ce fou-rire magistral à propos du « Boulon », merci pour la migration à l'IE, merci pour ton écoute, merci d'avoir adouci mon humeur et merci de m'avoir supportée (dans tous les sens du terme!)), Margaux-Alison (merci ma belle pour notre projet d'escargots, merci d'avoir organisé la béquie, merci pour tes commentaires avisés, tes critiques toujours constructives et ton soutien de façon générale), Héroïse (merci pour le week-end au soleil qu'on va pouvoir se faire et pour m'avoir aidé à boucler les résumés), Yasmine (merci pour les révisions d'allemand et ton assiduité à la gym), JT & Fabien (merci pour cette image que je ne décrirai pas ici mais qui restera à jamais gravée dans ma mémoire !!!, merci pour votre disponibilité), Cyril (merci pour cet instant magique à la cafèt'... oui, celui qui faisait appel à un torchon !), Steph (merci pour les cakes pas au chèvre et pour tout ce que je ne listerai pas ici...), Paulina (merci d'aimer les bretonnes!!!), Sara (merci pour le pied à terre milanais). Mes "colocs de jour", ce fût un plaisir de partager le bureau

avec vous : Pierre (merci pour nos délires M&M's et pour Junior), Marie (merci pour ton rire omniprésent et les débogages de code), Héro et Chris (ah, mais vous êtes encore là??!!). Merci à la team originelle pour l'intégration durant mon stage (et après), merci également aux gymnastes pour ces moments de défoulement: je peux le dire maintenant : "et on relâche COMPLETEMENT!".

Merci à mes potes hors-moulon qui ont également été présents durant ma thèse : Merci notamment à Hélène (pour nos papotages et tes conseils) et à Mathieu (pour les promenades-ciné-guitare et l'excursion à London qui tombait juste à point). Merci à mes "colocs de nuit" d'avoir partagé leur quotidien avec moi : Sophie, et maintenant Jojo (dernière ligne droite!!) et Robin. Merci à mes zouaves d'adoucir mon quotidien. Thank's Barbara Dunn to be so close even so far.

Merci à ma famille et particulièrement à mes sœurs et mes parents. Merci à Aïda, Math et Gwen pour leurs relectures/remarques/corrections de langue même à la dernière minute!

Ce manuscrit de thèse clôt une période fructueuse professionnellement et personnellement, je remercie tous les protagonistes qui ont aidé à ce que ce travail voit le jour. Encore une fois : MERCI!



# Sommaire

Liste des communications .....	ii
Avant-propos .....	iv
<b>Introduction.....</b>	<b>2</b>
1. Histoire évolutive des différents types de fermentation .....	5
2. Fonctions des écosystèmes fermentaires .....	9
3. Les microorganismes des produits fermentés .....	19
4. Services écosystémiques rendus par les microorganismes au cours du processus de fermentation .....	24
5. La fermentation du levain .....	28
6. Problématique et plan de la thèse .....	37
Bibliographie .....	42
 <b>Chapitre 1 : Matériel et méthodes .....</b>	 <b>60</b>
<b>Chapitre 2 : Sourdough microbial community dynamics : an analysis during French organic bread-making processes .....</b>	<b>98</b>
<b>Chapitre 3 : Pyrosequencing analysis of fungi communities in cereal-based fermented products.....</b>	<b>134</b>
<b>Chapitre 4 : Exploration of the sourdough yeast strains phenotypical characteristics and of the relation between microbial community and baker practices .....</b>	<b>180</b>
 <b>Discussion.....</b>	 <b>206</b>
1. Synthèse des résultats.....	208
2. Conservation de la biodiversité et microorganismes .....	210
3. Description de la diversité spécifique dans des levains naturels .....	211
4. Comparaison des méthodes culturales et non-culturelles pour l'analyse de la diversité des levures.....	212
5. Les levains naturels français produits à partir de farine issue de l'agriculture biologique : une diversité particulière .....	213
6. Description de l'ensemble de la communauté microbienne du levain et étude des qualités organoleptiques du pain associé.....	218
7. La diversité des levures en panification : intérêts, avantages et perspectives associées .....	219
Bibliographie .....	222
 <b>Annexes.....</b>	 <b>226</b>
- Annexe 1 : Questionnaire d'enquête menée auprès de boulangers et paysans-boulangers français..	227
- Annexe 2 : Comparaison des milieux YE et GEM pour le dénombrement en levures .....	228
- Annexe 3 : Protocole d'extraction d'ADN en plaque .....	229
- Annexe S : Résumé de la collection des souches isolées au cours de la thèse .....	233



## Liste des communications

### Communications nationales:

C. Urien, E. Lhomme, B. Onno, J. Legrand, X. Dousset & D. Sicard. 2012a. Dynamics of microbial communities during bread making process of seven french bakers "Le Petit Pois Dérivé", 28-31 Août, Avignon, France. (Poster)

C. Urien, E. Lhomme, B. Onno, J. Legrand, X. Dousset & D. Sicard. 2012b. Dynamique des communautés microbiennes au cours du processus de panification chez sept boulangers français "Colloque de restitution du DIM ASTREA 2008-2011", 1er Octobre, Paris, France. (Poster)

C. Urien, E. Lhomme, B. Onno, J. Legrand, X. Dousset & D. Sicard. 2013a. Dynamics of microbial communities during bread making process of seven french bakers. « Journée de l'Ecole Doctorale Gènes, Génomes, Cellules », 6 Février, Gif-sur-Yvette, France. (Poster)

C. Urien, E. Lhomme, B. Onno, J. Legrand, X. Dousset & D. Sicard. 2013b. Processus de panification et diversité microbienne de levains traditionnels français issus de l'Agriculture Biologique. « 4ème Journée des doctorants et des post-doctorants du DIM ASTREA », 29 Mars, Paris, France. (Communication)

E. Lhomme, C. Urien, D. Sicard, X. Dousset & B. Onno. 2013a. Dynamique et diversité des bactéries lactiques dans les levains de panification biologiques français. « 19ème édition du Club des Bactéries Lactiques », 16-18 Octobre, Bordeaux, France. (Communication)

C. Urien, E. Lhomme, C. Aulard, Y. Mouffok, X. Dousset, J. Legrand, A. Bourgeois, B. Onno & D. Sicard. 2013c. La levure de levains naturels en France: une diversité à préserver. « Journées Jeunes Chercheurs du département Biologie et Amélioration des Plantes de l'INRA », 17-18 Octobre, Gif-sur-Yvette, France. (Communication)

C. Urien, E. Lhomme, J. Legrand, & D. Sicard. 2014a. Yeast in natural organic French bread sourdoughs. « Levures Modèles et Outils », 7-9 Avril, Bordeaux, France. (Communication)

C. Urien, L. Huyghe, J. Legrand & D. Sicard. 2014b. Diversité spécifique des levures dans des levains naturels français. «Le Petit Pois Dérivé», 25-28 Août, Orsay, France. (Communication)

C. Urien. 2014. Les levures dans les levains naturels : quelle diversité ? Association Internationale du Pain Français, bulletin n°38, Décembre. (Article de vulgarisation)

### **Communications internationales:**

J. Legrand, C. Urien, T. Nidelet, O. Martin, C. Dillmann & D. Sicard. 2012. A research project on the dynamics of *Saccharomyces cerevisiae* populations in sourdough of a farmer-baker network. "Theoretical and empirical advances in evolutionary genomics". March 31-April 4, Roscoff, France. (Poster)

C. Urien, E. Lhomme, X. Dousset, B. Onno & D. Sicard. 2012c. Process and microbial diversity of French traditional organic sourdough and sourdough breadmaking. "The V International Symposium on Sourdough - Cereal Fermentation for Future Foods", 10.-12 October, Helsinki, Finland. (Communication)

C. Urien, E. Lhomme, B. Onno, J. Legrand, X. Dousset & D. Sicard. 2013d. Dynamics of microbial communities in French natural organic bread doughs. « Conference Young Researchers in Life Sciences », May 22-24, Paris, France. (Poster)

C. Urien, E. Lhomme, C. Aulard, Y. Mouffok , B. Onno, J. Legrand , X. Dousset & D. Sicard. 2013e. Microbial species diversity in French traditional organic bread doughs. « XIV Congress of the European Society for Evolutionary Biology », August 19-24, Lisboa, Portugal. (Poster)

E. Lhomme, C. Urien, D. Sicard, X. Dousset & B. Onno. 2013b. Microbial diversity of French traditional organic bread sourdoughs. « 2nd International Conference on Microbial Diversity », October 23-25, Torino, Italy. (Poster)

E. Lhomme, C. Urien, J. Legrand, X. Dousset, B. Onno & D. Sicard, accepted. Sourdough microbial community dynamics: an analysis during French organic bread-making processes. Food Microbiology. DOI: 10.1016/j.fm.2014.11.014 (Article)

## Avant-propos

Nous dégustons quotidiennement des produits fermentés. Prenons des exemples de repas effectués au cours d'une belle journée printanière. Une tasse de thé ou de café accompagnée de quelques tartines de pain beurrées au petit déjeuner ; un pique-nique composé de charcuteries, de fromage, de pain (bien sûr) et pourquoi pas de quelques cornichons, le tout arrosé d'une bière ou d'une bolée de cidre ; un diner composé de choucroute et d'un yaourt, accompagnés d'un verre de vin (rouge, rose ou blanc à votre convenance). Voilà, sans vous en rendre compte, vous venez de déguster des produits intégralement issus de la fermentation. Il n'y a pas que dans notre assiette que l'on retrouve les produits fermentés : ceux-ci sont ancrés dans notre culture. Pour preuve, je pourrai citer de nombreuses œuvres littéraires, cinématographiques ou encore plastiques. Je me contenterai des exemples suivants:

- les films « Le boulanger de Valorgue », d'Henri Verneuil (1953) et « La femme du boulanger » de Marcel Pagnol (1938) ;
- la bande dessinée « Les maîtres de l'orge », de Jean Van Hamme (volumes 1 à 8 parus entre 1992 et 2001 par Glénat) ;
- la « Chanson pour l'auvergnat » de Georges Brassens (1954) ;
- la peinture « Nature morte au verre de vin » peinte en 1928 par Émile Othon Friesz (1879/1949), huile sur toile 46/55 cm, collection du centre Georges Pompidou Paris.

Dans les mythologies, un dieu était associé au blé, aux moissons ou au pain: le dieu grec Déméter, le dieu romain Cérès ou encore la déesse égyptienne Isis. De plus, le pain est un des symboles des religions chrétiennes. Le pain de Saint Nicolas en Lorraine, et le pain de vendange à la Saint Michel (septembre) sont distribués à la sortie des offices. La bible décrit le pain comme le « fruit de la terre et du travail des Hommes ». Le patron des boulangers, fêté le 16 Mai, est Saint Honoré. Tous ces noms se retrouvent d'ailleurs dans les appellations du milieu de la boulange : « Déméter » est un label d'Agriculture Biologique, « Cérès à Honoré » est un fournil qui fait du pain au levain naturel,...

- Il est également intéressant de relever certaines étymologies:
- « copain » : signifie celui avec qui on partage le pain, vient de « compain »;
- « compagnie » : signifie ceux qui partagent le pain, vient de « com » et « panis » du latin « compania » ( Hansen et Schieberle 2005);
- Bethléem, la ville où est né Jésus, signifie « maison du pain ».

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à un écosystème particulier : le levain de panification, et plus particulièrement, aux populations de levures qui composent en partie la communauté microbienne du levain. Le levain est un mélange de farine et d'eau au sein duquel des



microorganismes spécifiques se développent: les levures et les bactéries lactiques. Ces microorganismes sont indispensables à l'utilisation du levain comme agent de pousse et ferment puisqu'ils sont responsables de la fermentation: ils consomment les sucres naturellement présents dans la farine pour produire, principalement, de l'éthanol, du lactate, de l'acétate du dioxyde de carbone et des composés aromatiques. L'utilisation du levain est aujourd'hui une alternative au mode de production de pain dit « à la levure ». Malgré l'importance des communautés microbiennes dans le fonctionnement de l'écosystème levain, leur composition reste mal décrite. Avant d'aborder la fermentation du levain au cours du processus de panification et la description des populations de levures dans cet écosystème, je présenterai les différents produits fermentés de l'alimentation humaine, leur histoire, leur diversité biologique et leurs fonctions.

# **INTRODUCTION**



1. Histoire évolutive des différents types de fermentation .....	5
1.1 La fermentation des produits d'origine végétale .....	5
1.2 La fermentation de produits d'origine animale .....	6
1.3 La fermentation : une production liée à l'Histoire humaine .....	8
2. Fonctions des écosystèmes fermentaires.....	9
2.1 Découverte des microorganismes fermenteurs.....	11
2.2 Activité des microorganismes au cours de la fermentation : exemple lors de la production du pain.....	12
2.2.1 Action fermentaire des bactéries .....	12
2.2.2 Action fermentaire des levures .....	16
2.2.3 Origine de la capacité fermentaire des levures .....	17
3. Les microorganismes des produits fermentés.....	19
3.1 Diversité des levures des produits fermentés.....	19
3.2 Domestication de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	22
4 Services écosystémiques rendus par les microorganismes au cours du processus de fermentation .....	24
4.1 Conservation et contrôle des pathogènes .....	25
4.2 Digestibilité et santé.....	26
4.3 Caractéristiques organoleptiques .....	27
4.4 Standardisation et contrôle des produits.....	28
5. La fermentation du levain.....	28
5.1 Levain et panification .....	28
5.2. La levure dans la fermentation au levain .....	32
6. Problématique et plan de la thèse .....	37
6.1 Objectifs .....	38
6.2 Questions posées .....	39
Bibliographie.....	42

## 1. Histoire évolutive des différents types de fermentation

Le mot fermentation viendrait, selon les sources, du latin *fermentatio, -onis*, (définition Larousse en ligne) ou du latin *fervōr, -oris* qui signifient bouillonnement, effervescence (dictionnaire Gaffiot, 1934). Il existe différents types de produits alimentaires fermentables : d'origine animale ou végétale ; liquides (vin, bière, kéfir, ...) ou solides (pain, fromage, saucisson,...). Dans cette partie, nous verrons comment sont apparues et se sont développées, au cours de l'Histoire, les fermentations de produits alimentaires courants tels que le fromage, le pain et le vin.

### 1.1 La fermentation des produits d'origine végétale

La fermentation de produits végétaux est menée par l'Homme depuis des millénaires. Elle s'est développée à travers le monde et concerne aussi bien des fruits que des graines.

Avant de transformer de manière consciente l'alimentation via la fermentation, les chasseurs-cueilleurs auraient découvert et consommé des fruits fermentés au cours de la préhistoire (Battcock & Azam-Ali 1998).

Des preuves d'existence de boissons fermentées à base de riz, miel et fruits datées d'environ 9 000 ans ont été découvertes en Chine (McGovern *et al.*, 2004). L'Égypte antique a longtemps été citée comme point de départ de trois types de fermentation : tout d'abord celles du vin (rouge puis blanc) et de la bière puis la fermentation du pain. La fermentation du moût de raisin existe sur le pourtour méditerranéen depuis au moins 7 000 ans (Valamoti *et al.*, 2007). Rouge, il était associé au sang d'Osiris en Égypte, mais des résidus de vin blanc ont été relevés dans une amphore de la tombe de Toutânkhamon (-1 327 environ). Des analyses chimiques de récipients ont permis de mettre en évidence les premières productions supposées de vin grâce à la présence d'acide L-tartique et de résine ajoutée volontairement au cours de la production pour améliorer le goût ou la conservation du vin (Guasch-Jané *et al.*, 2004 ; Guasch-Jané *et al.*, 2006 ; McGovern 1997 ; McGovern *et al.*, 2004 ; McGovern 2009 ; McGovern 2013). Des vestiges datant de -5 400/-5 000 ans avant Jésus-Christ ont été analysés en Iran (site de Hajji Firutz, Tepe, McGovern *et al.*, 1996) ainsi qu'au Sud-Est de l'Arménie (-4 000 avant JC, Barnard *et al.*, 2011), confirmant la production de vin au Moyen-Orient. D'après les documents administratifs contemporains de l'Égypte antique (-3 150/-30 environ), la bière était la « boisson nationale » des égyptiens (Darby *et al.*, 1977). Cependant, une étude plus récente a révélé que la fabrication de la bière remonterait à plus de 6 000 ans, dans le Sumer (actuelle Irak) (Hornsey 2003). La bière peut être produite à partir d'orge, de millet (Barth 2013 ;

Karp 1980 ; Netting 1964), de sorghum (Edwards 1996), de maïs ou de quinoa (La Barre 1938). Le pain levé serait apparu en Egypte antique avant d'être produit en Grèce, il y a environ 6 000 ans, puis dans le Nord/ Nord-Est de l'Europe (Hansson 1994). L'utilisation d'écume de bière, afin de faire lever la pâte à pain, a été observée par Pline l'ancien (23-79 après JC) chez les Gaulois et les Ibères alors que Grecs et Italiens, ne consommant pas de bière, utilisaient la farine de millet trempée dans du jus de raisin comme agent de fermentation (Rackham 1967). Des représentations graphiques des modes de production de pain et de bière ont été retrouvées sur des tombeaux tels que celui de Ramsès III (Figure 1). Dans les tombes, la présence de restes de miches de pain confirme ces productions il y a plusieurs millénaires (Samuel 2002).



**Figure 1:** Production de pain et de bière en Egypte antique, tombeau de Ramsès III.

Tout comme la production de pain, l'acquisition des techniques de fermentation de la bière serait apparue en Egypte antique puis se serait développée en Grèce antique avant d'être transmise aux romains via les gaulois et les Celtes (Zeuthen 2007). Les techniques de vinification se seraient propagées en Grèce (5 000 avant JC), puis en Italie (900 avant JC), en France (en 100 après JC), en Amérique (au XVIème siècle), puis en Asie (au XVIIème) et, enfin, en Océanie (au XIXème) (Legras *et al.*, 2007 ; Pretorius 2000).

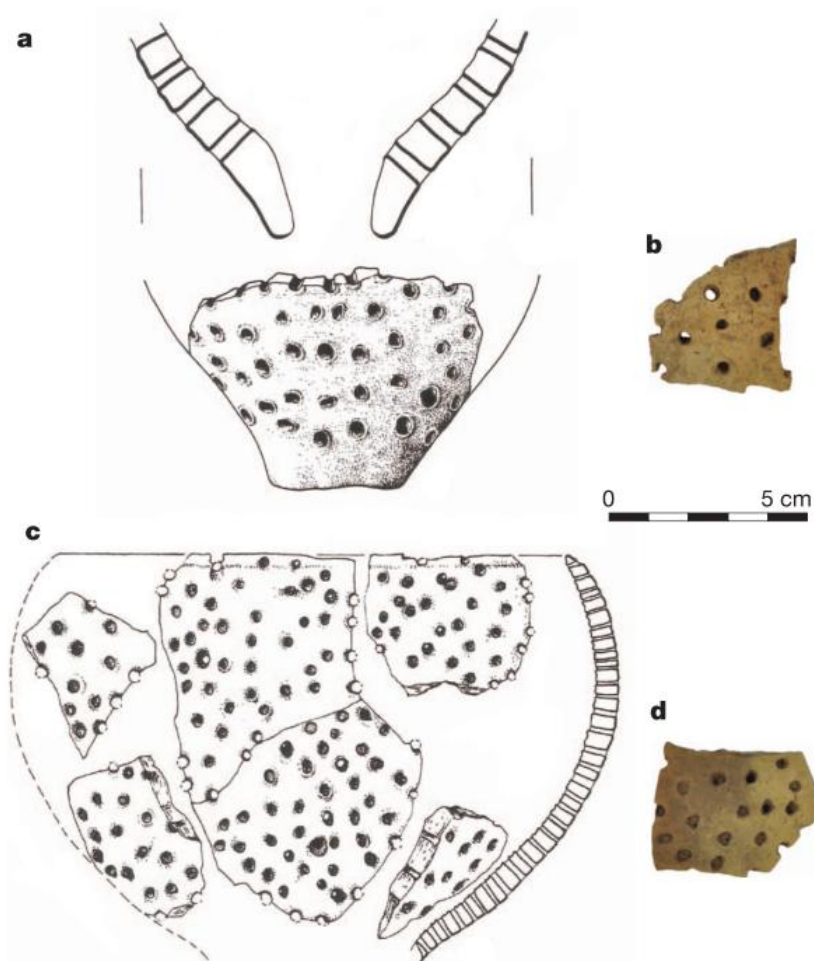
## 1.2 La fermentation de produits d'origine animale

Des produits d'origine animale peuvent également être fermentés : à partir de viande (saucisson ou salami) ou du lait (faisselle, fromage, kéfir de lait, beurre).

Prajapati & Nair (2003) situent l'apparition de l'utilisation de la fermentation pour les produits laitiers à environ 12 000 ans, dans la vallée de l'Indus, située au nord-ouest de l'Inde actuelle. L'analyse archéologique des poteries (formes, analyse au Carbone 13/ Carbone 12) permet de dater et comprendre la fabrication des produits fermentés d'origine animale (Figure 2, Dudd & Evershed

1998 ; Salque *et al.*, 2013). La production du beurre remonterait à plus de 8 000 ans en Inde (Prajapati & Nair 2003). Des résidus de fromage contenus dans des jarres en Pologne (région de Cujavie) ont révélé une production de faisselle en Europe depuis au moins 7 500 ans (Salque *et al.*, 2013). Alors que des résidus de kéfir, datant de 4 000 ans, ont été isolés près de momies dans des tombeaux en Chine (Yang *et al.*, 2014).

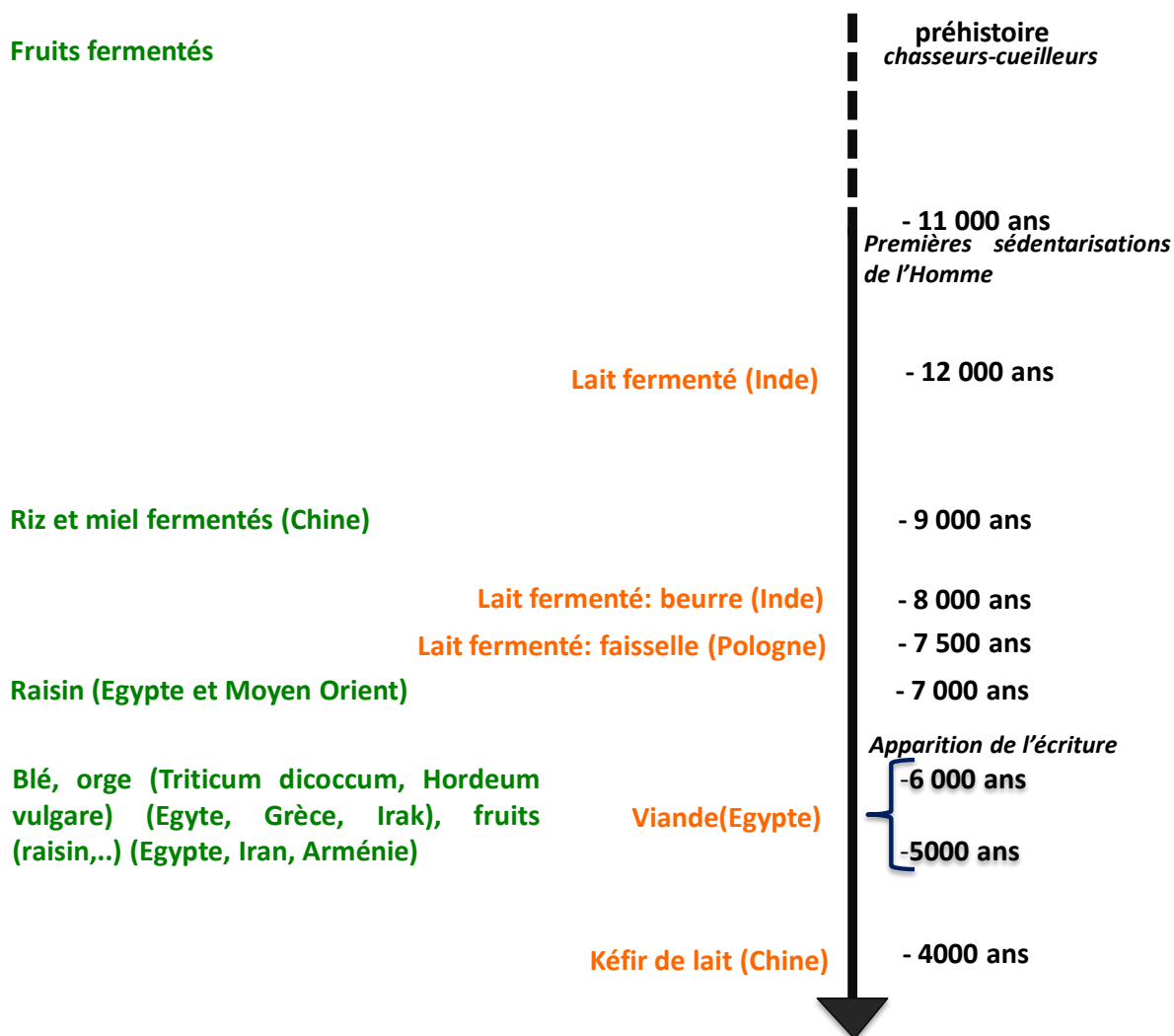
Les saucissons font également partie des produits fermentés. La fermentation des saucissons se fait grâce au mélange de graisse et de viande, de sel, d'adjuvants de salaison (nitrate, nitrite), de sucre et d'épices (Caplice & Fitzgerald 1999). Le salage et le séchage de la viande remonteraient à l'Égypte antique (Pearson & Gillett 1996). Il existe encore localement des spécialités de viande séchée et fermentée : le *pastirma* arménien ou le *jerky* turque.



**Figure 2 :** Extrait de Salque *et al.*, 2013 : dessins (a,c) et photographies (b,d) de récipients ayant servi à confectionner du fromage dans la région de Kuyavia, Pologne, environ 5 000 ans avant JC.

### 1.3 La fermentation : une production liée à l'Histoire humaine

L'Homme, à travers le processus de fermentation, a su développer des produits alimentaires particuliers qui aujourd'hui sont étroitement liés à chaque culture et société. Il est difficile de dater et de localiser avec exactitude le berceau des fermentations menées par l'Homme. Cependant, quatre origines géographiques semblent possibles : en Asie (au niveau de la Chine et de la vallée de l'Indus) ; en Afrique (au niveau de l'Egypte) ; en Mésopotamie et en Europe (Figure 3).



**Figure 3** : Chronologie de l'apparition des fermentations pour l'alimentation des produits végétaux (en vert) et animaux (en orange). D'après Battcock & Azam-Ali 1998 ; Darby *et al.*, 1977 ; Hansson 1994 ; Hornsey 2003 ; McGovern *et al.*, 2004 ; Pearson & Gillett 1996 ; Prajapati & Nair 2003 ; Salque *et al.*, 2013 ; Valamoti *et al.*, 2007 ; Yang *et al.*, 2014.

En avant-propos, nous avons pu constater l'importance des produits fermentés dans l'alimentation et la culture française. Bien au-delà de ces constats, les produits fermentés font partie intégrante des sociétés humaines à travers les cultures, les rites religieux, la médecine et l'Histoire. Pour exemple,



on les cite aussi bien dans la littérature (*Le corbeau et le renard* de Jean de la Fontaine), que dans la liturgie (« la cène » de la bible ; « les croyants » du coran ou encore le rituel du Chavouot dans la religion juive) ou dans des épopées anciennes (*l'Odyssée* d'Homère). Outre les offrandes de vin aux divinités lors de cérémonies religieuses, l'utilisation des produits fermentés peut être médicinale, notamment en Asie. L'usage peut également être populaire, comme l'était la bière au temps de l'Égypte antique (McGovern 2009). En fait, le développement du processus de fermentation est étroitement lié à l'avancé et la durabilité des sociétés humaines mais également à l'instauration de rites et actes sociaux (Joffe 1998 ; Legras *et al.*, 2007). Lors de la construction des villages au moyen-âge, les bâtiments prioritairement édifiés étaient l'église, le moulin et le four à pain (Roussel & Chiron 2005). Le pain était alors un aliment central de l'alimentation des français. Le pain est également lié à des événements tragiques comme l'incendie qui ravagea la cité de Londres en 1666. Le feu, qui avait démarré dans une boulangerie située sur les bords de la Tamise, s'est propagé pendant trois journées entières, détruisant en partie la ville (exposition du Museum of London, Juin 2014).

Où, quand et pourquoi l'Homme a-t-il commencé à utiliser la fermentation pour son alimentation ? Ces questions restent ouvertes. Les découvertes archéologiques permettront peut-être de découvrir de nouveaux vestiges et d'affiner nos connaissances sur l'utilisation des produits fermentés par l'Homme au cours de l'Histoire.

## 2. Fonctions des écosystèmes fermentaires

Un écosystème est l'ensemble que forment, dans une aire donnée, les facteurs abiotiques (relatifs au non vivant) et la communauté des espèces (définition de Campbell & Reece 2004). La communauté est l'ensemble des populations de différentes espèces habitant une aire donnée (définition de Campbell & Reece 2004). L'espèce est le taxon (l'unité) de base de la systématique, c'est-à-dire de l'organisation de la diversité du vivant en un système de référence (définition de (Thomas *et al.*, 2010)). Une population est un groupe d'individus de la même espèce habitant une région géographique particulière à un moment déterminé (définition de Campbell & Reece 2004). Une communauté se définit entre autre par sa richesse spécifique, c'est-à-dire par le nombre d'espèces qu'elle comporte (définition de Campbell & Reece 2004) et par sa diversité spécifique, qui prend en compte à la fois le nombre d'espèces présentes dans un écosystème donné et leur abondance relative (Gotelli & Chao 2013). Il existe différents indices de diversité comme les indices de Shannon

ou de Simpson, couramment utilisés en écologie. La densité de population correspond au nombre d'individus par unité d'aire ou de volume (définition de Campbell & Reece 2004).

Nous considérons ici l'écosystème fermentaire, au sein duquel interagissent :

- la communauté des microorganismes, responsables de la fermentation ;
- les substrats animaux et/ou végétaux, fournisseurs primaires de matière organique nécessaire à la fermentation ;
- l'homme, qui agit sur les facteurs abiotiques au cours du processus de fermentation (gestion des températures de fermentation, ajout de matière substrat (farine, eau, sucre) et sur les facteurs biotiques (ajout volontaire ou involontaire de microorganismes).

Les produits alimentaires fermentés peuvent se classer en deux groupes distincts :

- 1) Ceux où les microorganismes qui participent à la fermentation sont principalement des champignons autres que les levures : le thé (Berkowitz *et al.*, 1971 ; Pasha & Reddy 2005), le tempeh, les produits fermentés de soja (Bisping *et al.*, 1993 ; Liem *et al.*, 1977 ; Nakajima *et al.*, 2005 ; Steinkraus *et al.*, 1960) ou l'oncom, aliment typique indonésien (Fardiaz & Markakis 1981) ;
- 2) Ceux où les bactéries lactiques (LAB) et les levures sont les microorganismes qui participent à la fermentation en produisant de l'acide lactique ou de l'éthanol : le saucisson ( Aquilanti *et al.*, 2007 ; Encinas *et al.*, 2000 ; Mendonça *et al.*, 2013 ; Zeuthen 2007), la fermentation du millet (Pedersen *et al.*, 2012) ou du teff (Ashenafi 1994), le fromage (Salque *et al.*, 2013), la faisselle, le chou (Chang *et al.*, 2008), le kéfir (Leite *et al.*, 2012), la bière (Boulton & Quain 2008), le togwa (Mugula *et al.*, 2003), le cidre, le saké, le Makgeolli (Jung *et al.*, 2012), le vinaigre de riz (Haruta *et al.*, 2006),...

Seule la seconde catégorie, sera approfondie dans la suite de cette introduction.

La fermentation, ou « la vie sans l'air » selon Pasteur (1822-1895) est un processus de lente décomposition des substances organiques par des microorganismes ou par un complexe enzymatique d'origine animale ou végétale (Bourdichon *et al.*, 2012). En d'autres termes : la fermentation est un processus qui permet de produire des composés tels que l'éthanol (fermentation alcoolique) ou le lactate (fermentation lactique), à partir de composés carbonés comme le glucose.

Les microorganismes connus pour participer à la fermentation des aliments sont principalement les bactéries lactiques, les levures et autres champignons tels les *Penicillium* du fromage (Battcock & Azam-Ali 1998). Différentes interactions affectent les éléments vivants d'un écosystème, ici la communauté microbienne. Ces interactions ont lieu entre organismes d'une même population, c'est à dire entre des individus (ici, souches) d'une même espèce partageant une niche écologique (interaction intraspécifique) ou entre différentes espèces de la communauté (interaction interspécifique). Dans les produits fermentés, les microorganismes, en plus d'être soumis à une pression de sélection due aux facteurs abiotiques de l'écosystème, interagissent biologiquement à travers des phénomènes de compétition (la présence de l'organisme A affecte négativement l'organisme B et réciproquement), de mutualisme (la présence de l'organisme A affecte positivement l'organisme B et réciproquement), de neutralisme (la présence de l'organisme A n'affecte pas l'organisme B et inversement) et peut être de commensalisme (la présence de l'organisme A affecte positivement l'organisme B sans que l'organisme A n'en soit affecté) et de parasitisme (la présence de l'organisme A affecte négativement l'organisme B, l'organisme A est positivement affecté par cette interaction).

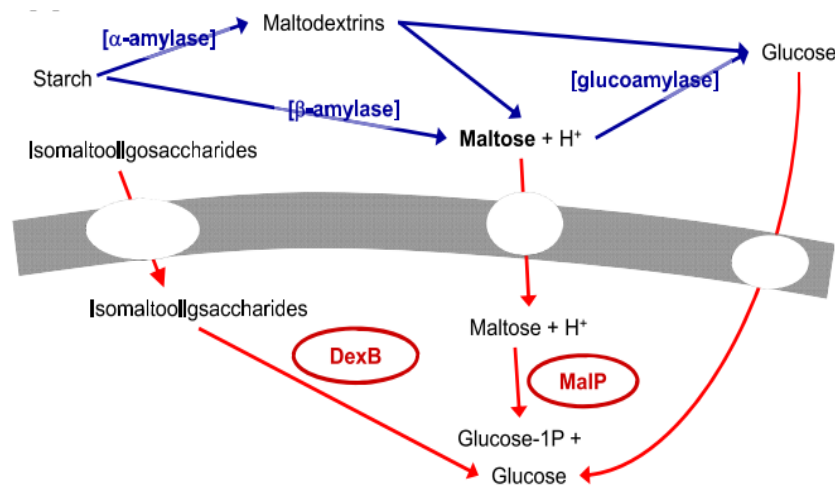
## 2.1 Découverte des microorganismes fermenteurs

La perception par l'homme de l'activité des microorganismes au cours de la fermentation a évolué au cours de l'Histoire. En 1665, Antoni van Leeuwenhoek & Robert Hooke ont mis en évidence la présence de microorganismes dans le processus de fermentation (Gest 2004). Pasteur a confirmé, deux siècles plus tard, l'implication des microorganismes dans la fermentation. En 1868, le chimiste Justus Liebig écrivait que la fermentation du pain par les levures en détériorait les qualités nutritionnelles. Des écrits d'un économiste, datant de 1906, indiquent que les produits alimentaires doivent être frais, la fermentation causant des indigestions (Leroy *et al.*, 2013). Au même moment, Ilya Ilyich Mechnikov (prix Nobel de physiologie et médecine en 1908) promouvait déjà l'effet des probiotiques (microorganismes vivant qui, ingérés en quantité suffisante, ont un effet bénéfique sur la santé en améliorant l'équilibre de la flore intestinale, définition du dictionnaire Larousse en ligne 2014) sur la santé humaine, notamment pour combattre les microorganismes infectieux ([http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1908/mechnikov-bio.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1908/mechnikov-bio.html), consulté le 23/06/2014). Un siècle plus tard, nous savons que le corps humain est en symbiose avec  $10^{14}$  cellules microbiennes par gramme (Ley *et al.*, 2006 ; Reid *et al.*, 2003). Le concept de microbiome humain est apparu il y a dix ans, révélant que la composition biologique du corps humain est en grande partie composé de génome autre qu'humain (Lederberg 2004). Outre leur rôle dans la digestion du bol alimentaire, les microorganismes du tube digestif peuvent être liés à certaines pathologies telles que

l'obésité, l'autisme, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, le syndrome du colon irritable, certaines allergies ou des maladies psychiatriques (Clayton 2012 ; David *et al.*, 2014 ; Frank *et al.*, 2007 ; Kassinen *et al.*, 2007 ; Penders *et al.*, 2007 ; Selhub *et al.*, 2014 ; Sokol *et al.*, 2006 ; Turnbaugh *et al.*, 2008).

## 2.2 Activité des microorganismes au cours de la fermentation : exemple lors de la production du pain

Je prendrais ici l'exemple des microorganismes du levain de panification afin de présenter l'activité des bactéries lactiques et des levures au cours de la fermentation. La farine est naturellement riche en glucide sous forme d'amidon et, en faible proportion, sous forme de monosaccharides et disaccharides: maltose, fructose, saccharose et glucose (Gänzle 2014). Les enzymes amylases, naturellement présentes dans la farine, s'activent en présence d'eau pour dégrader l'amidon et produire principalement le maltose et d'autres sucres: monosaccharides et disaccharides (Figure 4). La fermentation par les microorganismes se fait à partir de ces sucres simples, dans le levain.

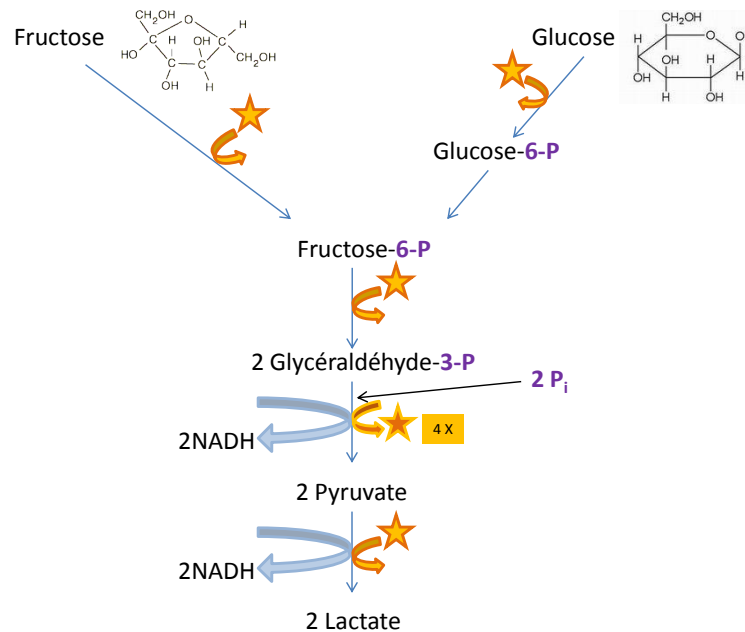


**Figure 4** : Métabolisme de l'amidon et conversion de la maltodextrine dans les levains de blé ou de seigle (extrait de Gänzle 2014).

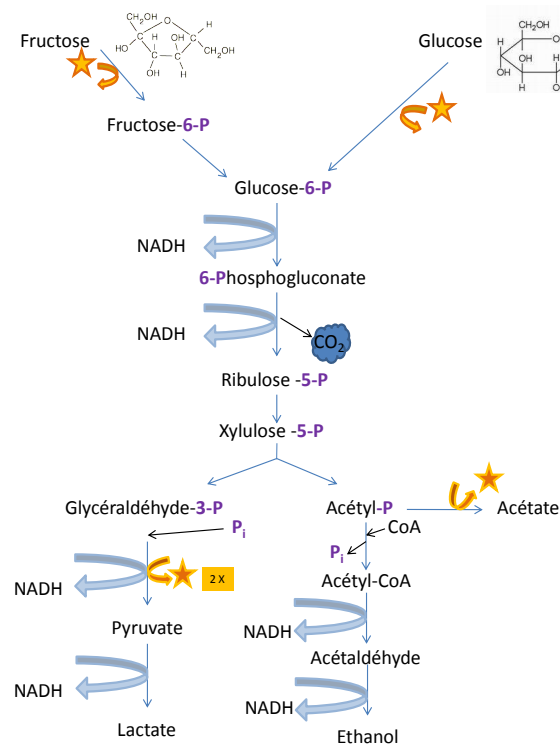
### 2.2.1 Action fermentaire des bactéries

Les bactéries qui jouent un rôle fermentaire lors de la mise en place d'un levain sont des bactéries lactiques (LAB). Les LAB présentent une activité homo- et/ou hétéro-fermentaire (Caplice & Fitzgerald 1999), dont dépend la fermentation des hexoses, c'est-à-dire des sucres à six atomes de carbone. La voie métabolique homofermentaire des bactéries lactiques permet la production de

lactate à partir d'une molécule de fructose et d'une molécule de glucose (Figure 5). La voie métabolique hétérofermentaire des bactéries lactiques permet la production de lactate, de  $\text{CO}_2$ , d'acétate et d'éthanol (Figure 6).



**Figure 5:** Voie métabolique homofermentaire des bactéries lactiques (adapté de McDonald *et al.*, 1991) avec production de lactate. Flèche et l'étoile cernées de orange : consommation d'ATP ; flèche et l'étoile cernées de jaune : production d'ATP.



**Figure 6:** Voie métabolique hétérofermentaire des bactéries lactiques (adapté de McDonald *et al.*, 1991) avec production de lactate, de  $\text{CO}_2$ , d'acétate et d'éthanol. Flèche et l'étoile cernées de orange : consommation d'ATP ; flèche et l'étoile cernées de jaune : production d'ATP.

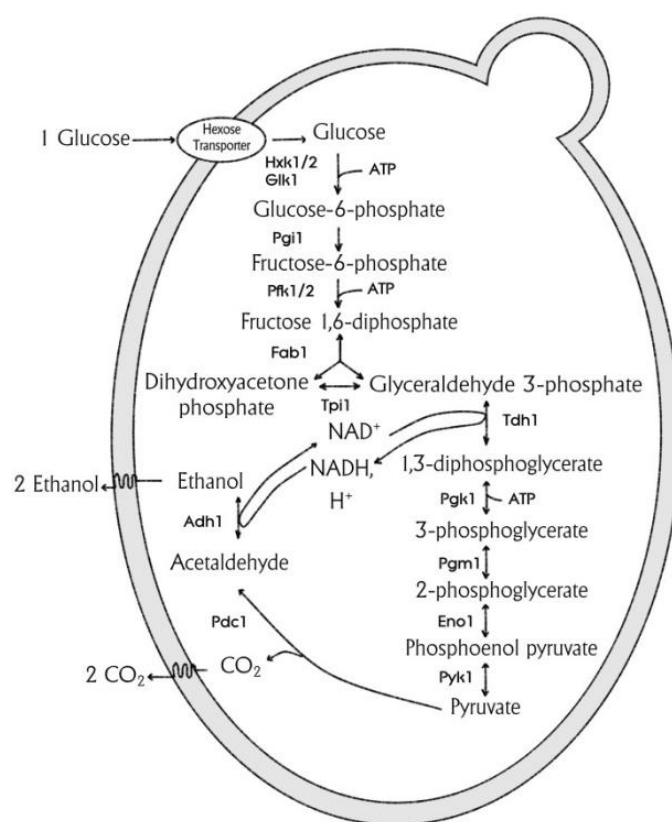
Au cours de la fermentation du glucose ou du fructose par les LAB, il y a production d'acide lactique, acétique, d'éthanol ainsi que de CO<sub>2</sub>. Ces composés jouent un rôle dans la conservation, le goût ou encore la texture du pain. Plus de 50 espèces de LAB ont été isolées à partir de levain (Tableau 1). Il faut noter que les bactéries homofermentaires ne produisent pas de CO<sub>2</sub> et que les bactéries hétérofermentaires ne produisent qu'une molécule de lactate par glucose. Certaines LAB, dites maltoses positives, dégradent le maltose en produisant du glucose. Le fructose pourra être fermenté ensuite par la voie de la glycolyse.

**Tableau 1:** Liste des espèces de bactéries lactiques isolées à partir de produits de panification (extrait de Onno *et al.*, 2009).

Pays	Produits et méthodes d'identification	Bactéries lactiques	
		Homofermentaire et hétérofermentaire facultatif	Hétérofermentaire
B	Levains de blé et seigle; génotypiques	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. paralimentarius</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Pc. is,</i>	<i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. sanfranciscensis</i> , <i>Lb. acidifarinae</i> , <i>Lb. zymae</i>
DK	Levains de seigle ; phénotypiques	<i>Lb. amylovorus</i>	<i>Lb. reuteri</i> , <i>Lb. panis</i> ,
Fin	Levains de seigle ; phénotypiques	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. casei</i>	
F	Levains de blé ; phénotypiques	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>aceus</i> , <i>Lb. curvatus</i>	<i>Lb. brevis</i> , <i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> , <i>Ln. ides</i> subsp. <i>dextranicum</i> ,
	Levains de blé ; phénotypiques	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> , <i>Pc. pentosaceus</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lb. curvatus</i>	<i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. brevis</i> subsp. <i>lindneri</i> , <i>Ln. mesent.</i> , <i>Ln ides</i> sbsp. <i>dext</i> , <i>Ln citreum</i>
	Levains de blé ; phénotypiques et PCR	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Pc. pentosaceus</i> ,	<i>Lb. brevis</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i>
	Levains de blé ; RFLP, ITS, primers ;	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. paralimentarius</i> , <i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. nantensis</i> ,	<i>Lb. sanfranciscensis</i> , <i>Lb. hammesii</i> , <i>Lb. spicheri</i> , <i>Ln. ides</i>
D	Levains de blé ; phénotypiques	<i>Lb. delbrueckii</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. casei</i> , ,	<i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. buchneri</i>
	Levains de seigle ; phénotypiques	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. farciminis</i> , <i>Lb. alimentarius</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. plantarum</i> ,	<i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. buchneri</i> , <i>Lb. sanfranciscensis</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. fructivorans</i>
	Levains de seigle ; phénotypiques	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. farciminis</i> , <i>Lb. alimentarius</i> , <i>Pediococcus</i> spp.	<i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. buchneri</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. fructivorans</i> , <i>Lb. sanfranciscensis</i> ,
	Levains de blés (Panettone, pain); phénotypiques	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. farciminis</i> , <i>Lb. homochiochii</i> ,	<i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. hilgardii</i> , <i>Lb. sanfranciscensis</i> , <i>W. viridescens</i>
	Levains de seigle ; RAPD-PCR Levains de seigle ; PCR-DGGE	<i>Lb. amylovorus</i> , <i>Lb. johnsonii</i> , <i>Lb. crispatus</i> ,	<i>Lb. pontis</i> , <i>Lb. frumenti</i> , <i>Lb. reuteri</i> <i>Lb. sanfranciscensis</i> , <i>Lb. mindensis</i> , <i>Lb. pontis</i> , <i>Lb. panis</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. frumenti</i> , <i>Lb. reuteri</i>
Gr	Levains de blé; phénotypiques et génotypiques	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Lb. paralimentarius</i> ,	<i>Lb. sanfranciscensis</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>W. cibaria</i>
It	Panettone; methods phénotypiques	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. brevis</i> ,
	Panettone, Brioche; phénotypiques	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Pediococcus</i> spp.	<i>Lb. sanfranciscensis</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Ln. mesenteroides</i> ,
	Levains /blés (Umbria) phénotypiques	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. farciminis</i>	<i>Lb. sanfranciscensis</i>
	Pâtes à pizza (Naples) ; phénotypiques	<i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. plantarum</i> ,	<i>Ln. gelidum</i> , <i>Ln. mesenteroides</i>
	Levains de blé (Verona); RAPD-PCR Levains de blé (Lombardia); PCR Levains de blé (Apulia) ; séquençage 16S rDNA et PCR des ITS	<i>Lb. alimentarius</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i>	<i>Lb. sanfranciscensis</i> <i>Lb. sanfranciscensis</i> <i>Lb. sanfranciscensis</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Ln. citreum</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>W. confusa</i> , <i>Lb. rossiae</i>
Iran	Sangak; phénotypiques	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Pc. cerevisiae</i>	<i>Ln. mesenteroides</i> , <i>Lb. brevis</i> ,
Mex	Pozol (maize); 16S rDNA sequencing	<i>Lc. lactis</i> , <i>S. suis</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. alimentarius</i> , <i>Lb. delbrueckii</i>	
Mar	Levains de blé ; phénotypiques	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Pediococcus</i> sp.	<i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. buchneri</i> , <i>Ln. mesenteroides</i> ,
	Levains de blé ; phénotypiques	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Pc. pentosaceus</i>	<i>Lb. buchneri</i> , <i>Lb. sanfranciscensis</i> , <i>Ln. mesenteroides</i> ,
Port	Broa, phénotypiques	<i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Ec. casseliflavus</i> , <i>Ec. durans</i> , <i>Ec. faecium</i> , <i>S. constellatus</i> , <i>S. equinus</i>	<i>Leuconostoc</i> spp. <i>Lb. brevis</i> ,
Rus	Levains de seigle ; phénotypiques	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. fermentum</i>
Esp	Levains de blé ; phénotypiques	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. brevis</i> ,
	Levains de blé ; phénotypiques		<i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. cellobiosus</i> , <i>Ln. mesent.</i>
Soud	Kirsa (sorgho)	<i>Lb. amylovorus</i>	<i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. reuteri</i> ,
	Kirsa; RAPD	<i>Ec. faecalis</i> , <i>Lc. lactis</i> , <i>Lb. vaginalis</i> , <i>Lb. helveticus</i>	<i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. reuteri</i> ,
Suè	Levains de seigle et de blé; phénotypiques	<i>Lb. delbrueckii</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> , <i>Lb. farciminis</i> ,	<i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. sanfranciscensis</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>W. viridescens</i>
	Levains de seigle ; phénotypiques	<i>Lactobacillus</i> sp., <i>Pc. pentosaceus</i>	
USA	Levain de blé ; phénotypiques		<i>Lb. sanfranciscensis</i>

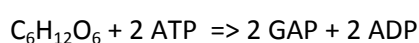
## 2.2.2 Action fermentaire des levures

En condition anaérobie, les levures sont capables de fermenter. De plus, certaines levures (dites « Crabtree positive ») peuvent également fermenter les sucres en condition aérobie si la concentration en glucose est importante : c'est l'« effet Crabtree » (Hagman *et al.*, 2013 ; Rhind *et al.*, 2011 ; Rozpędowska *et al.*, 2011). Au cours de la fermentation par les levures, le glucose est transformé en pyruvate par la voie de la glycolyse ou « voie d'Embden-Meyerhof ». La glycolyse a lieu dans le cytosol de la levure et permet l'assimilation des sucres d'un milieu par la cellule (Figure 7).



**Figure 7:** Fermentation alcoolique et étapes enzymatiques au sein de *Saccharomyces cerevisiae* (Faria-Oliveira *et al.*, 2013).

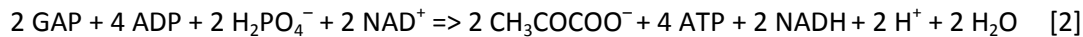
Dans un premier temps, la dégradation du glucose ( $C_6H_{12}O_6$ ) en glycéraldéhyde-3-phosphate (GAP) met en jeu une chaîne de quatre réactions enzymatiques et implique la dégradation de deux molécules d'adénosine triphosphate (ATP) en adénosine diphosphate (ADP).



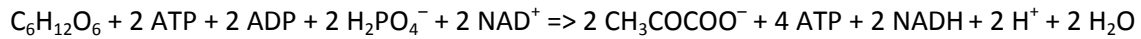
[1]



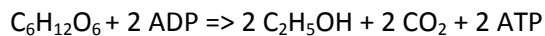
Dans un second temps, la conversion du GAP en pyruvate ( $\text{CH}_3\text{COCOO}^-$ ) permet la récupération d'une partie de l'énergie du GAP sous forme d'ATP et il y a formation de NADH.



D'après [1] et [2], le bilan de la glycolyse s'écrit :



Ensuite, la voie de la fermentation transforme le pyruvate issu de la glycolyse et il y a production d'acétaldéhyde, puis d'éthanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) via une réaction d'oxydation du NADH. C'est la production finale d'éthanol qui donne son nom à la « fermentation alcoolique ». L'équation globale de la fermentation alcoolique a été décrite dès 1815 par Louis Joseph Gay-Lussac :

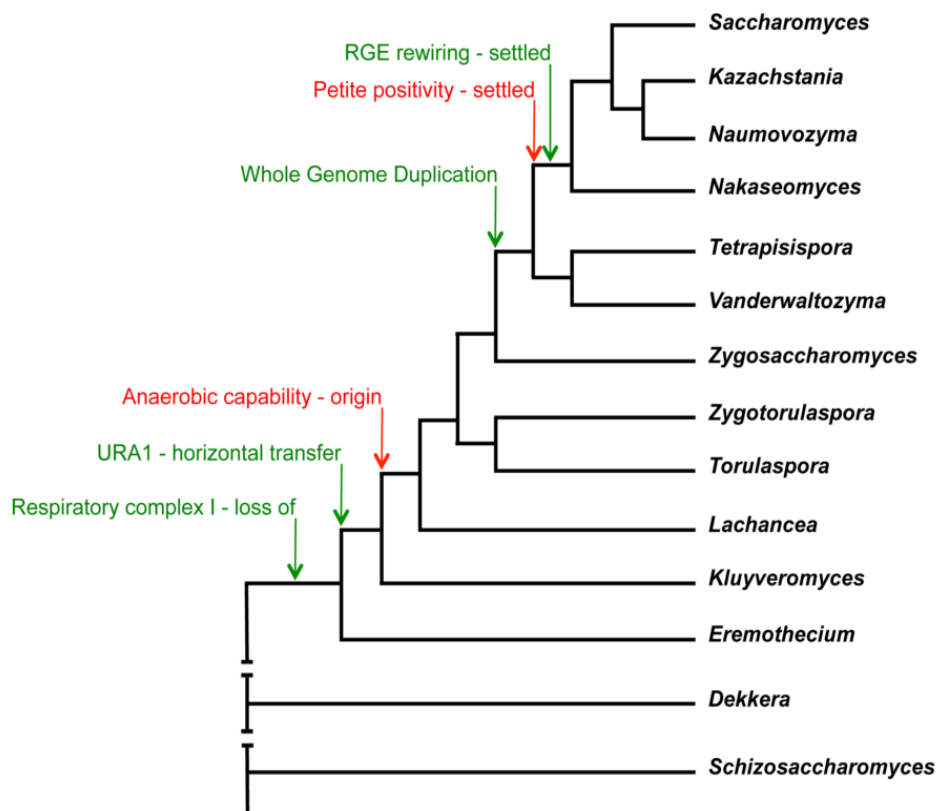


Il faut noter que les levures sont capables de cataboliser d'autres monosaccharides que le glucose, comme le fructose et le mannose qui sont phosphorylés en fructose-6-phosphate et entrent dans la glycolyse. Les disaccharides, comme le maltose, le saccharose et le lactose doivent être, quant à eux, hydrolysés en monosaccharide par des hydrolases ou phosphorylase. Les polysaccharides, que l'on trouve dans les produits à fermenter, comme l'amidon des végétaux ou le glycogène des animaux, sont dégradés en mono et di-saccharides par des amylases, notamment celles de bactéries et des mycètes.

### 2.2.3 Origine de la capacité fermentaire des levures

L'origine de la capacité à fermenter des levures est encore controversée mais il semble qu'elle ait des origines génomiques différentes selon les clades, avec des processus évolutifs distincts pour trois espèces ou groupes d'espèces : celui comprenant les genres *Saccharomyces*, *Kazachstania*, *Naumovozyma* et *Nakaseomyces* d'une part, le genre *Dekkera* d'autre part, et enfin, le genre *Schizosaccharomyces* (Hagman *et al.*, 2013). Les différents événements de modification du génome associés à l'acquisition de la capacité de fermenter par les organismes du premier groupe sont décrits dans la figure 8. La capacité à fermenter est également possible grâce à une duplication de gène, distincte et postérieure à la duplication totale du génome, pour obtenir les gènes *ADH1* et *ADH2* de l'alcool déshydrogénase (Thomson *et al.*, 2005). L'enzyme de l'alcool déshydrogénase facilite la production d'éthanol à partir d'acétaldéhyde et consommation de NADH (Figure 8). Le genre *Saccharomyces sensu stricto* est un clade (ensemble de taxons qui descendent tous, sans exception, d'un même ancêtre commun, définition de Thomas *et al.*, 2010) composé d'au moins neuf espèces en isolement reproducteur post-zygotique, c'est-à-dire produisant des descendants stériles après

reproduction entre individus d'espèces différentes (Kurtzman *et al.*, 2011). Quatre de ces espèces (*S. paradoxus*, *S. cariocanus*, *S. mikatae* et *S. kudriavzevii*) sont majoritairement isolées dans des environnements naturels alors que les autres (*S. cerevisiae*, *S. arboricolus*, *S. bayanus var. bayanus*, *S. pastorianus* et *S. bayanus var. uvarum*) sont également isolées dans des produits alimentaires fermentés (Naumova *et al.*, 2010). Alors que *S. bayanus var. bayanus* semble spécifiquement associée à la fermentation de la bière lager (Nakao *et al.*, 2009 ; Naumova *et al.*, 2005) et *S. bayanus var. uvarum* à la fermentation du moût de raisin et des pommes pour la production de vin et de cidre (Naumova *et al.*, 2005), l'espèce *S. cerevisiae* est associée à la fermentation du moût de raisin (production de vin), du houblon ou de l'orge (production de bière), du blé (production de pain) et du riz (production de saké ; Naumova *et al.*, 2010).



**Figure 8 :** Relations phylogénétiques des levures et innovations génétiques liées à la capacité de fermenter des genres *Saccharomyces*, *Kazachstania*, *Naumovozyma* et *Nakaseomyces* (extrait de Hagman *et al.*, 2013). Respiratory complex I-loss of = perte du complexe respiratoire I ; URA1 – horizontal transfer = transfert horizontal du gène *URA1* ; Whole Genome Duplication = duplication totale du génome ; Petite positivity – settled = mutation du génome entraînant une incapacité à croître sur substrat carboné non fermentable (glycérol ou éthanol) ; RGE rewiring – settled = mutation entraînant la perte du RGE (rapid growth element) (Jiang *et al.*, 2008).

#### 2.2.4 Autres actions métaboliques des bactéries lactiques et des levures

Au-delà de la production du CO<sub>2</sub>, des acides (acétique, lactique) et de l'éthanol par fermentation, levures et bactéries lactiques produisent des composés aromatiques (tels que des alcools, aldéhydes, diacétyl, acétoïne et esters, (Birch *et al.*, 2013 ; Frasse *et al.*, 1993 ; Schieberle & Grosch 1991) et diminuent l'effet négatif de certains métabolites (comme l'acide phytique (Khetarpaul & Chauhan 1990)). Cette thèse ne traite pas des propriétés métaboliques ou aromatiques des levures. Néanmoins, il est important de garder à l'esprit que :

- les propriétés aromatiques dépendent des souches microbiennes en présence (Birch *et al.*, 2013) ;
- les bactéries lactiques et les levures interagissent dans les produits fermentés (exemple de la libération de facteurs de croissance par les levures, permettant le développement des bactéries en surface des fromages (Corsetti *et al.*, 2001 ; Marcellino & Benson 1992 ; Piton 1988 ; Reys 1993 ; Schmidt *et al.*, 1978).

### 3. Les microorganismes des produits fermentés

D'après le catalogue sur les microorganismes d'intérêt dans les fermentations alimentaires rédigé en 2012, 195 espèces de bactéries et 69 espèces de levures-moisissures ont été identifiées comme ayant une activité métabolique au sein de produits fermentés (Bourdichon *et al.*, 2012). C'est plus du double de ce qui a été publié 10 ans auparavant lors du « 2002 IDF inventory » (Seifert & Mogensen 2002). Nous pouvons donc imaginer que certaines espèces qui jouent un rôle clef dans le processus de fermentation n'ont pas encore été décrites dans ces conditions et qu'il existe peut-être même des espèces de microorganismes qui n'ont pas encore été observées : c'est-à-dire de « nouvelles espèces » qui restent à découvrir. De par leur impact sur la fermentation et sur la santé humaine, l'étude des microorganismes des environnements fermentés est une priorité internationale (FAO-CGRFA 2009).

#### 3.1 Diversité des levures des produits fermentés

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée aux levures et plus particulièrement à l'ordre des *Saccharomycetales*, du sous-phylum des *Saccharomycotina*. Ces eucaryotes unicellulaires appartiennent au règne des champignons et sont caractérisés par leur division cellulaire par bourgeonnement, parfois par scission. La cellule peut être sphérique, ovale ou cylindrique. La

reproduction sexuée est possible chez certaines espèces, via la fusion de deux cellules de types sexuels différents (Brock & Madigan 1991). Les levures ont diverses niches écologiques : dans des milieux naturels (sur/dans les fruits, sur les arbres, dans le sol...) ou dans les milieux anthropisés (chez l'homme, dans les produits fermentés naturels et industriels de l'alimentation ou en pharmacie). Certaines espèces isolées de l'homme ou des produits fermentés sont des pathogènes opportunistes (comme *Candida tropicalis*, *C. zeylanoides*, *Pichia fermentans*, *Rhodotorula mucilaginosa* ou *Citeromyces matritensis* (Anaissie *et al.*, 2009 ; Dismukes *et al.*, 2003 ; Euzéby 2008), c'est-à-dire pathogènes chez des personnes immuno-déficientes (Jacques & Casaregola 2008 ; Miceli *et al.*, 2011). D'autres espèces sont commensales à l'homme, naturellement présentes dans le tractus digestif, sur les muqueuses et la peau, et également présentes dans des produits fermentés (Kurtzman *et al.*, 2011).

Via la production de produits fermentés, l'homme a sélectionné, volontairement ou non, les levures les plus adaptées aux conditions environnementales de ces écosystèmes (Tableau 2). Certaines souches de levures, de l'espèce *S. cerevisiae* par exemple, ayant des traits d'histoire de vie favorables pour croître dans un milieu fermenté donné comme la bière, ont été domestiquées au fil des siècles (Libkind *et al.*, 2011).

**Tableau 2:** Liste d'espèces de l'ordre des *Saccharomycetales* isolées à partir de produits fermentés (Adapté de Ashenafi 1994 ; Bing *et al.*, 2014 ; Bourdichon *et al.*, 2012 ; Chang *et al.*, 2008 ; Corsetti *et al.*, 2001 ; Csoma *et al.*, 2010 ; Daniel *et al.*, 2009 ; Encinas *et al.*, 2000 ; Haruta *et al.*, 2006 ; Li *et al.*, 2011 ; Lopandic *et al.*, 2006 ; Marsh *et al.*, 2013 ; Pedersen *et al.*, 2012 ; Reale *et al.*, 2013).

genre	espèce	produit animal	produit végétal
<i>Wickerhamomyces</i>	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>		vin
<i>Wickerhamomyces</i>	<i>Wickerhamomyces pijperi</i>		vin
<i>Lodderomyces</i>	<i>Candida orthopsilosis</i>		cacao
<i>Lodderomyces</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	viande	
<i>Lodderomyces</i>	<i>Candida tropicalis</i>		végétaux
<i>Lodderomyces</i>	<i>Lodderomyces spp.</i>		kimchi
<i>Pichia</i>	<i>Pichia fermentans</i>	produits laitiers	vin
<i>Pichia</i>	<i>Pichia kluyveri</i>		vin
<i>Pichia</i>	<i>Pichia kudriavzevii</i>	produits laitiers	cacao
<i>Pichia</i>	<i>Pichia kudriavzevii</i>		cacao, produits laitiers, végétaux
<i>Pichia</i>	<i>Pichia manshurica</i>		cacao
<i>Pichia</i>	<i>Pichia membranifaciens</i>	produits laitiers	
<i>Pichia</i>	<i>Pichia naganishii</i>		levain de panification
<i>Pichia</i>	<i>Pichia norvegensis</i>		végétaux
<i>Pichia</i>	<i>Pichia occidentalis</i>	produits laitiers	végétaux
<i>Meyerozyma</i>	<i>Candida carpophila</i>		cacao
<i>Meyerozyma</i>	<i>Meyerozyma caribbica</i>		cacao
<i>Saccharomyces</i>	<i>Saccharomyces bayanus</i>		vin, bière
<i>Saccharomyces</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	produits laitiers	vin, bière, cidre, alcool de fruits, cacao, vinaigre de riz, levain de panification
<i>Saccharomyces</i>	<i>Saccharomyces pastorianus</i>		bière
<i>Saccharomyces</i>	<i>Saccharomyces unispora</i>	produits laitiers	levain de panification
<i>Saccharomyces</i>	<i>Saccharomyces uvarum</i>		vin
<i>Kazachstania</i>	<i>Candida humilis/milleri</i>		levain de panification
<i>Kazachstania</i>	<i>Kzachstania exigua</i>	produits laitiers	levain de panification
<i>Kazachstania</i>	<i>Kazachstania unispora</i>	produits laitiers	
<i>Torulaspora</i>	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	produits laitiers	vin, produits laitiers
<i>Citeromyces</i>	<i>Citeromyces matritensis</i>	viande	
<i>Clavispora</i>	<i>Candida intermedia</i>	viande	
<i>Cyberlindnera</i>	<i>Cyberlindnera jadinii</i>	produits laitiers	
<i>Cyberlindnera</i>	<i>Cyberlindnera mrakii</i>		vin
<i>Debaryomyces</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>	produits laitiers, viande	levain de panification
<i>Dekkera</i>	<i>Dekkera bruxellensis</i>		boissons (bière, vin, cidre)
<i>Geotrichum</i>	<i>Geotrichum candidum</i>	produits laitiers	
<i>Hanseniaspora</i>	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>		vin
<i>Hanseniaspora</i>	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>		cacao
<i>Hanseniaspora</i>	<i>Hanseniaspora osmophila</i>		vin
<i>Hanseniaspora</i>	<i>Hanseniaspora uvarum</i>		vin
<i>Kluyveromyces</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>	produits laitiers	
<i>Kluyveromyces</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	produits laitiers	levain de panification, végétaux
<i>Kodamaea</i>	<i>Kodamaea ohmeri</i>		cacao
<i>Kurtzmaniella</i>	<i>Candida oleophila</i>		vin
<i>Kurtzmaniella</i>	<i>Candida zeylanoides</i>	produits laitiers, viande	
<i>Lachancea</i>	<i>Lachancea fermentati</i>		vin
<i>Lachancea</i>	<i>Lachancea thermotolerans</i>		vin
<i>Metschnikowia</i>	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>		vin
<i>Naumovozyma</i>	<i>Naumovozyma castellii</i>		kéfir de lait
<i>Saccharomycodes</i>	<i>Saccharomycodes ludwigii</i>		cacao
<i>Schwanniomyces</i>	<i>Schwanniomyces vanrijiae</i>		vin
<i>Starmerella</i>	<i>Candida etchellsii</i>	produits laitiers	soja, végétaux
<i>Starmerella</i>	<i>Starmerella bacillaris</i>		vin
<i>Starmerella</i>	<i>Starmerella bombicola</i>		vin
<i>Trigonopsis</i>	<i>Trigonopsis cantarellii</i>		vin
<i>Yamadazyma</i>	<i>Yamadazyma mexicana</i>		cacao
<i>Yarrowia</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>	produits laitiers, viande	
<i>Zygosaccharomyces</i>	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>		soja
<i>Zygotorulaspora</i>	<i>Zygotorulaspora florentina</i>	produits laitiers	
non affiliée	<i>Candida rugosa</i>	produits laitiers	végétaux
non affiliée	<i>Candida versatilis</i>	produits laitiers	soja

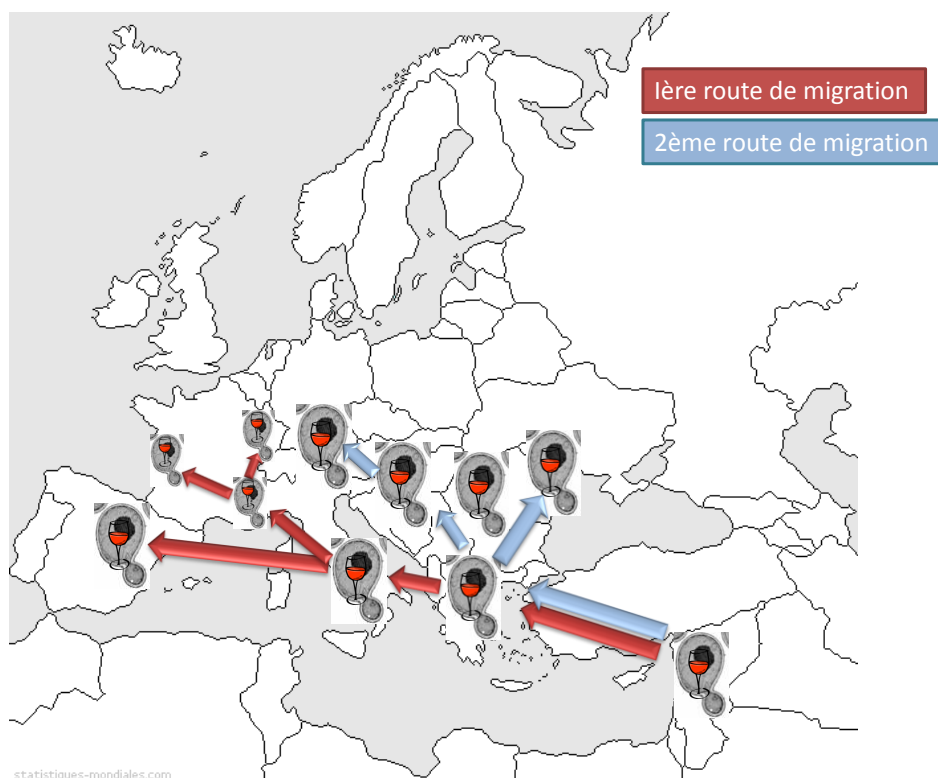
### 3.2 Domestication de *Saccharomyces cerevisiae*

Les levures sont présentes dans différentes niches écologiques, c'est-à-dire dans des environnements aux propriétés particulières permettant l'occupation par une espèce (définition de Mayr 2001). Pour l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*, ces niches sont des environnements naturels tels que les troncs d'arbre, le sol, les fruits, le corps humain, et des environnements anthropisés dont les produits alimentaires fermentés. L'espèce *S. cerevisiae* a subi différents événements de domestication qui ont amené à la sélection de souches adaptées aux environnements anthropisés fortement stressants pour des microorganismes (pression osmotique élevée, variation de la température,...). La domestication est la transformation d'une espèce sauvage en espèce soumise à une exploitation par l'homme, en vue de lui fournir des produits ou des services (Dictionnaire Larousse en ligne). L'acquisition, la perte ou le développement de caractères morphologiques, physiologiques et/ou comportementaux suite à un isolement, une sélection volontaire ou une interaction prolongée avec l'homme est appelé syndrome de domestication. La domestication peut agir, à travers les forces évolutives, sur le génome et les fréquences alléliques, c'est-à-dire la fréquence à laquelle on retrouve la version d'un gène (unité d'information de l'ADN qui spécifie un caractère), dans une population donnée (définition de Thomas *et al.*, 2010). Il existe quatre forces évolutives : la dérive génétique, la migration, les mutations et la sélection naturelle.

**La dérive génétique** (modification aléatoire des fréquences alléliques dans une population, du fait de phénomènes stochastiques, définition de Thomas *et al.*, 2010) agit lors du processus de domestication car seul un échantillon de la diversité génétique et phénotypique des populations naturelles est conservé dans l'environnement anthropisé. De plus, la domestication de l'espèce à partir d'un nombre limité d'individus aurait entraîné un goulot d'étranglement, c'est-à-dire que le faible nombre de reproducteurs restants aurait transmis seulement une fraction de la diversité génétique initiale aux générations ultérieures. L'étude du génome des souches de *S. cerevisiae* provenant de différents produits fermentés peut permettre de comprendre quand et dans quel sens ont eu lieu les événements de domestication. L'échantillon de la diversité originelle contenu dans les populations des nouveaux environnements diffère selon la niche écologique (bière, pain, vin,...) s'il n'y a pas de flux migratoire suffisant entre ces niches pour homogénéiser les populations. Par exemple, il y aurait au moins deux événements de domestication pour les boissons fermentées : une pour le saké et les fermentations à partir de riz et l'autre pour la fermentation du moût de raisin. La divergence entre ces deux événements de domestication remonterait à 11 900 ans (Fay & Benavides 2005).

**La migration** (au sens strict : mouvement des organismes entre populations ; au sens large : mouvement de gènes entre les populations = flux de gènes, définition de Thomas *et al.*, 2010) agit

également au cours du processus de domestication. Ainsi, concernant la fermentation du moût de raisin, les levures auraient une origine principale unique (moyen orient), puis les sous-groupes divergeraient en fonction des voies de migration : le Danube, le Rhône, et la Méditerranée (Fay & Benavides 2005 ; Legras *et al.*, 2007, Figure 9). Le flux de gènes implique que: si la migration est forte entre les populations de deux milieux anthropisés, les populations présenteront la même diversité génétique ; s'il n'y a pas de migration entre les deux milieux, la diversité génétique sera différente entre deux populations de milieux différents. Ainsi, une comparaison de souches domestiquées et de souches isolées d'environnements naturels a montré que la variabilité génétique était plus importante dans les souches isolées dans les environnements naturels (Fay & Benavides 2005). De plus, une étude de la diversité génétique des souches isolées de produits fermentés (pain, boissons alcoolisées, lait fermenté), provenant de la nature (écorce d'arbre) et de laboratoire a révélé que les souches se regroupaient d'avantage selon la niche écologique que d'après l'origine géographique (Sicard & Legras 2011). Ces patrons de diversité génétique constituent des arguments en faveur de l'hypothèse de l'apparition de l'espèce *S. cerevisiae* dans les environnements naturels avant sa domestication par l'homme.



**Figure 9:** Routes de migration des souches de levures *S. cerevisiae* liées à la vinification (Figure réalisée d'après Legras *et al.*, 2007).

**La mutation** (changement ponctuel irréversible du matériel génétique, transmissible de génération en génération, définition de Thomas *et al.*, 2010) est un autre processus évolutif impliqué dans la domestication. Les mutations du génome apparaissent naturellement dans les populations. Si une mutation induit une modification du phénotype, le génotype associé sera positivement ou négativement sélectionné par la sélection naturelle (définition de Mayr 2001). Concernant la domestication de *S. cerevisiae*, nous pouvons citer l'exemple de l'activation du gène de floculation *FLO11* par les souches domestiquées dans la fermentation du « vin de voile » (Fidalgo *et al.*, 2006 ; Ishigami *et al.*, 2004) ou encore la présence et le nombre de répétitions du gène *SSU1* permettant la résistance aux sulfites lors de la vinification (Nardi *et al.*, 2010 ; Yuasa *et al.*, 2004).

**La sélection naturelle** est le processus qui supprime de la population, à chaque génération, les individus à la valeur sélective (espérance de la contribution relative aux générations ultérieures estimée par la survie, la fertilité ou encore le nombre de descendants à la génération suivante, définition de Thomas *et al.*, 2010) la plus faible (définition de Mayr 2001). Ainsi, les génotypes associés aux souches les moins adaptées au milieu anthropisé sont évincés de la population au cours de la domestication. Cette force évolutive conduit à la sélection de cellules de grosse taille (Albertin *et al.*, 2009 ; Spor *et al.*, 2008 ; Spor *et al.*, 2009) qui produisent moins d'éthanol en privilégiant une stratégie de stockage des ressources (Spor *et al.*, 2009) dans les milieux domestiqués comparées aux souches issues de populations d'environnements naturels. Dans certains cas, l'action des forces évolutives peut entraîner des différences tellement importantes entre des individus de deux populations qu'il en résulte un isolement reproducteur et donc l'apparition d'une nouvelle espèce. Pour illustrer cela, il est intéressant de s'intéresser aux différences de niveau de ploïdie (nombre d'exemplaires de chaque chromosome dans la cellule). En effet, il semble que les souches de boulangerie soient autotétraploïdes (possèderaient quatre copies du génome, issues de la même espèce) contrairement aux souches isolées d'œnologie, diploïdes (ne possédant que deux copies du génome, Albertin *et al.*, 2009). Cet élément indique que la domestication de souches de levures pourrait être à l'origine d'innovations génétiques allant jusqu'à l'apparition de nouvelles espèces puisque les souches diploïdes et tétraploïdes sont en isolement reproducteur.

#### 4 Services écosystémiques rendus par les microorganismes au cours du processus de fermentation

Les biens et services que l'homme peut obtenir des écosystèmes, de façon directe ou indirecte sont appelés "services écosystémiques". Il peut s'agir de services rendus par l'écosystème d'un point de vue agroalimentaire, sanitaire ou encore culturel. Les microorganismes sont les acteurs principaux



des services écosystémiques rendus dans les écosystèmes fermentaires à travers la protection contre les pathogènes ou l'augmentation de la digestibilité du produit.

Au début du XX<sup>ème</sup> siècle, Metchnikoff associait une prolongation de la durée de vie du consommateur à l'ingestion de produits fermentés (Metchnikoff réédité en 1987). En ce sens, la fermentation améliore la valeur nutritionnelle de l'aliment. Il est également intéressant de souligner le rôle de la fermentation dans le développement des civilisations humaines (Poutanen *et al.*, 2009 ; van Boekel *et al.*, 2010). Pour mieux comprendre et percevoir cela, il faut revenir sur les services écosystémiques rendus par les microorganismes au cours de la fermentation des aliments.

#### 4.1 Conservation et contrôle des pathogènes

Le premier intérêt des produits fermentés est leur durée de conservation : la fermentation permet d'augmenter la sécurité alimentaire à travers l'inhibition de pathogènes (Adams & Nicolaidis 1997 ; Adams & Mitchell 2002) ou la suppression de composés toxiques (Hammes & Tichaczek 1994). Sous forme de saucisson, la viande animale se conserve jusqu'à plusieurs mois, alors que sa consommation doit normalement être immédiate après la mort de l'animal. De même, la transformation du lait en fromage permet d'augmenter la durée de vie des produits laitiers. En effet, il suffit de quelques heures seulement pour que des microorganismes pathogènes se développent dans les aliments. C'est le cas par exemple, de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ou encore les espèces du genre *Salmonella* qui peuvent avoir de graves conséquences sur les consommateurs immunodéprimés (Pierre & Veit 1996). Or, le processus de fermentation, grâce au développement de certains microorganismes particuliers permet de réduire le nombre de pathogènes dans les aliments notamment *Clostridium*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* and *Bacillus* spp. (Caplice & Fitzgerald 1999). La croissance des microorganismes pathogènes est contrôlée via la production, au cours de la fermentation, d'inhibiteurs métaboliques tels que des acides, de l'alcool ou du dioxyde de carbone (Caplice & Fitzgerald 1999) mais également via la production de bactériocines telles que la sakacine, la lactocine, la lactacine, la plantacine (produite par *Lactobacillus plantarum*) ou la plantaricine (Abee *et al.*, 1995 ; Ho 2008 ; Sahl *et al.*, 1995 ; Venema *et al.*, 1995). Le pH faible des produits fermentés permet une plus grande activité des bactériocines (Garcerá *et al.*, 1993; Mortvedt-Abildgaard *et al.*, 1995). La présence d'éléments antibactériens a été mise en évidence dans des produits fermentés tels que la viande (Cintas *et al.*, 1997 ; Schillinger & Lücke 1989), les grains de riz (Kimura *et al.*, 1997), ou le kimchi (Choi *et al.*, 1999). De plus, les communautés microbiennes spécifiques à l'environnement fermenté assurent, par compétition, une protection contre les agents pathogènes comme *Listeria* dans le fromage (Bleicher *et al.*, 2010 ; Eppert *et al.*, 1997 ; Imran *et al.*, 2010 ; Maoz *et al.*, 2003 ; Millet *et al.*, 2006 ; Retureau *et al.*, 2010 ;

Roth *et al.*, 2010 ; Saubusse *et al.*, 2007). Au cours de l'Histoire, les boissons fermentées se sont substituées à l'eau, alors contaminée par des pathogènes, pour l'hydratation du corps humain (McGovern 2009). Enfin, les microorganismes fermenteurs peuvent limiter l'effet d'autres microorganismes, néfastes, sur la fermentation. Par exemple, les spores de bactéries telles que *Bacillus subtilis* ou *Bacillus licheniformis* peuvent limiter la levée de la pâte à pain (Ali *et al.*, 2012). L'acide acétique produit au cours de la fermentation par les microorganismes fermenteurs permet d'inhiber la germination des spores des bactéries sus-citées (Marín *et al.*, 2002 ; Pattison *et al.*, 2004).

A l'origine, l'allongement de la durée de vie des denrées devait être le principal intérêt de la fermentation alimentaire.

#### 4.2 Digestibilité et santé

La fermentation permet également la transformation de l'aliment pour le rendre plus digeste (Caplice & Fitzgerald 1999). Par exemple, la fermentation du lait en faisselle, fromage ou kéfir en facilite la digestion pour les personnes intolérantes au lactose. L'activité de la lactase, produite dans l'estomac des bovins (ou présure), est utilisée depuis la préhistoire par l'homme pour produire du fromage. En effet, à cette époque, les hommes étaient probablement intolérants au lactose (Salque *et al.*, 2013). Aujourd'hui, 35% des adultes à travers le monde peuvent digérer le lactose via l'expression de lactase, mais il existe de fortes disparités géographiques : 90% des adultes d'Europe du nord sont tolérants au lactose contre 50% en Europe méditerranéenne (Gerbault *et al.*, 2013). En Asie, où la proportion d'intolérants au lactose est très importante, le kéfir permet la consommation de produit laitier (Yongfa *et al.*, 1984). Un autre exemple primordial est la réduction de la toxicité du manioc grâce à la fermentation (Caplice & Fitzgerald 1999). En effet, la consommation du manioc est responsable de certaines maladies comme le « Konzo », paralysant les membres inférieurs et lié à la présence de composés cyanés dans la plante (Howlett *et al.*, 1990 ; Mbelesso *et al.*, 2009). La fermentation du manioc empêche l'ingestion de cyanure grâce à la réduction des composés cyanés (Agbor Egbe *et al.*, 1995).

La fermentation du blé dans le levain permet la transformation des sucres et augmente la digestibilité du pain. La fermentation au levain, c'est-à-dire par un mélange de farine et d'eau préalablement fermenté, naturellement riche en bactéries lactiques et en levures, permet de réduire davantage la quantité d'acide phytique contenue dans la pâte à pain qu'avec une fermentation uniquement à la levure (Brune *et al.*, 1992 ; Lopez *et al.*, 2000 ; Lopez *et al.*, 2001 ; Lopez *et al.*, 2002 ; Reale *et al.*, 2004 ; Shatta *et al.*, 2004 ; Yousif & Safaa 2014). Ce composé doit en effet être ingéré en faible concentration car il inhibe l'absorption de certains minéraux (Sandberg & Svanberg 1991).

Enfin, les organismes microbiens issus de produits fermentés peuvent avoir des effets bénéfiques sur la digestion et être utilisés comme probiotiques. Par exemple, certaines souches isolées de starter de fermentation du millet sont utilisées comme probiotiques (Pedersen *et al.*, 2012).

Les aliments fermentés sont des sources de microorganismes vivants ou non, qui pourraient contribuer positivement à notre microbiome de par leur structure membranaire ou la production de métabolites particuliers (voir Drouault & Corthier 2001 pour revue). Les découvertes scientifiques sur les implications du microbiote digestif sur la santé humaine ne font que commencer (Clayton 2012 ; David *et al.*, 2014 ; Frank *et al.*, 2007 ; Kassinen *et al.*, 2007 ; Penders *et al.*, 2007 ; Selhub *et al.*, 2014 ; Sokol *et al.*, 2006 ; Turnbaugh *et al.*, 2008) et l'impact de la communauté microbienne des produits fermentés sur notre propre organisme n'est pas totalement connu.

#### 4.3 Caractéristiques organoleptiques

Enfin, la fermentation induit des propriétés organoleptiques particulières au produit final : sa couleur, sa texture, ses arômes (Lacroix *et al.*, 2010 ; Marilley 2004 ; Sicard & Legras 2011 ; Smit *et al.*, 2005).

Au cours du processus de fermentation la couleur est modifiée aussi bien en œnologie (Sims *et al.*, 1995) que dans les produits animaux comme les saucissons (Zhang *et al.*, 2007). Grâce aux dégagements de CO<sub>2</sub> par les levures et, dans une moindre mesure, par les bactéries, la texture des produits fermentés est modifiée : c'est le cas lors de la panification ou l'élaboration des fromages. Le développement de la flaveur (goût et odeur) est lié au métabolisme des acides aminés (Caplice & Fitzgerald 1999 ; Kieronczyk *et al.*, 2003). En effet, les enzymes protéolytiques produites par les microorganismes pendant la fermentation sont des composants responsables de la flaveur (Kunji *et al.*, 1996 ; McGarry *et al.*, 1994). Par exemple, la flaveur de la mie de pain dépend des réactions enzymatiques qui ont cours lors du processus de fermentation (Hansen & Hansen 1996). En surface des fromages, des enzymes sont produites par les microorganismes et induisent la formation de molécules alcalines qui pénètrent au cœur du produit et en caractérisent le goût (Reps 1993 ; Smacchi *et al.*, 1999). Certaines flaveurs particulières sont déterminées par des associations LAB-levures (Corsetti *et al.*, 2001 ; Martin *et al.*, 1999). La composition en microorganismes, c'est à dire la communauté microbienne résidente, détermine en grande partie la production d'acides, les arômes et la levée de la pâte dans le pain (De Vuyst & Neysens 2005 ; Hammes & Gänzle 1998 ; Rosenquist & Hansen 1998). Des produits dont la composition microbienne diffère n'auront pas les mêmes goûts, flaveurs ou utilisations car les activités enzymatiques sont propres à chaque espèce (Caplice & Fitzgerald 1999).

#### 4.4 Standardisation et contrôle des produits

Nous avons vu jusqu'à présent l'importance des bactéries et des levures au cours de la fermentation. Or, les normes strictes d'hygiène dans l'industrie agro-alimentaire, à travers, notamment, l'aseptisation des chaînes de fabrication, entraînent une réduction voire une suppression totale de la flore naturelle après stérilisation de la matière première; elles obligent le producteur à ajouter des microorganismes contrôlés pour réussir à mener à bien le processus de fermentation (Garabal 2007). D'autre part, le contexte de mondialisation et de standardisation des produits contraint le producteur à une standardisation et une homogénéisation de sa production. Pour faciliter l'homogénéisation des produits, une flore adaptée peut être ajoutée en amont de la fermentation comme les levains commerciaux standardisés (Caplice & Fitzgerald 1999). Des recherches sont menées dans ce contexte et des souches aux propriétés spécifiques sont développées pour leur compétitivité, la formation d'exopolysaccharides qui modifient la viscosité du levain ou encore la contribution à la saveur (par exemple Vogel *et al.*, 2002).

L'élaboration de starters microbiens est donc un enjeu économique majeur pour de nombreux produits fermentés (produits laitiers, vin, bière et pain notamment). Quelle communauté utiliser pour obtenir tel arôme? Quelle bactérie associer à telle levure pour obtenir la saveur recherchée? L'industrie agro-alimentaire peut encore travailler longtemps sur ces questions.

### 5. La fermentation du levain

#### 5.1 Levain et panification

##### 5.1.1 Rappel historique de la panification au levain

Comme nous l'avons vu précédemment, le pain levé est produit depuis plus de 5 000 ans (Wood 1989). Mais ce n'est que des millénaires plus tard que la production de pain s'est généralisée, en se répandant depuis Rome à travers son empire (Dupaigne 1999).

Au début du XX<sup>ème</sup> siècle, en France, en moyenne 900 grammes de pain étaient consommés quotidiennement par personne. En 2009, cette ration descendait à 136 grammes. Malgré la diminution de sa consommation, le pain reste un des aliments les plus consommés en France (10 milliards de baguettes sont consommées en France par an).

Le pain levé était originellement réalisé à l'aide d'un levain, c'est à dire un mélange de farine et d'eau où se développe naturellement une communauté de microorganismes: les bactéries lactiques et les levures. Le levain était un reste de pâte de la fournée précédente (eau, farine et sel) (Jacob 2007). Il peut aujourd'hui également être un reste de levain conservé lors de la fournée précédente (eau,

farine). L'utilisation de levure, provenant de brasserie, en ajout au levain date au moins de 1560 (Roussel & Chiron 2005). À partir de 1770, des mélanges de levures de brasserie pressées sont vendus aux boulangers afin de simplifier la panification et de gagner du temps. A partir de 1874, une nouvelle levure provenant de distillerie de grains, plus performante en termes de levée, se conservant mieux et présentant de meilleures qualités organoleptiques, est produite en France : c'est le début de la course des levuriers pour obtenir le marché de la levure dite « de boulangerie » commerciale, c'est à dire des souches de *S. cerevisiae*. Depuis la fin de la seconde guerre mondiale, l'industrie a sélectionné et hybridé les souches de levures afin de les rendre plus performantes et adaptées aux différents produits de panification (Roussel & Chiron 2005).

La plupart du pain que l'on consomme aujourd'hui est réalisé grâce à la fermentation à la levure "de boulangerie". Cependant, certains boulangers préparent encore aujourd'hui du pain au levain naturel, sans ajout de levure commerciale: ce sont ces pratiques et ces levains auxquels nous nous sommes intéressés. La production du pain au levain nécessite un processus de panification particulier, qui influence le goût et les arômes du produit final (Hansen & Schieberle 2005, Figure 10).

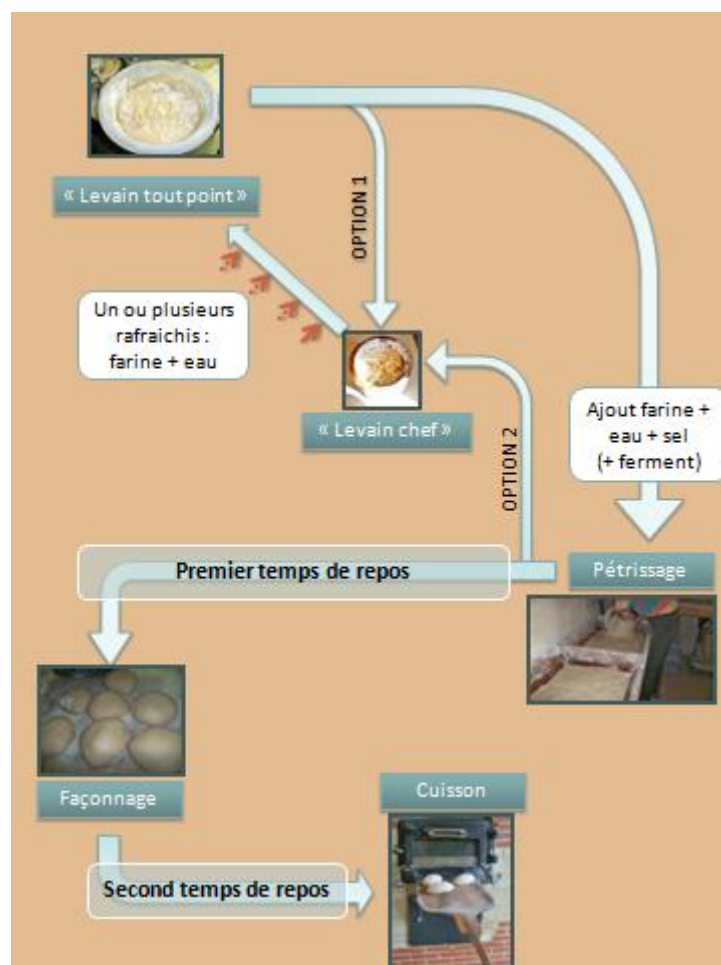


Figure 10: Schéma du processus de panification au levain

### 5.1.2 Processus de panification et de maintien du levain

Le levain est un mélange de farine et d'eau laissé en fermentation puis nourri (ajout de farine et d'eau) régulièrement, jusqu'à l'obtention du « levain chef » (« Chief sourdough ») qui sera un des ingrédients clef des panifications suivantes (Figure 11). L'élaboration du « levain chef » est indispensable pour la panification au levain car il est le point de départ de toute panification au levain. Le « levain chef » est généralement initié une fois, mais peut être élaboré à nouveau au cours de l'activité de panification d'un boulanger (selon les pratiques ou s'il y a perte du « levain chef » initial).

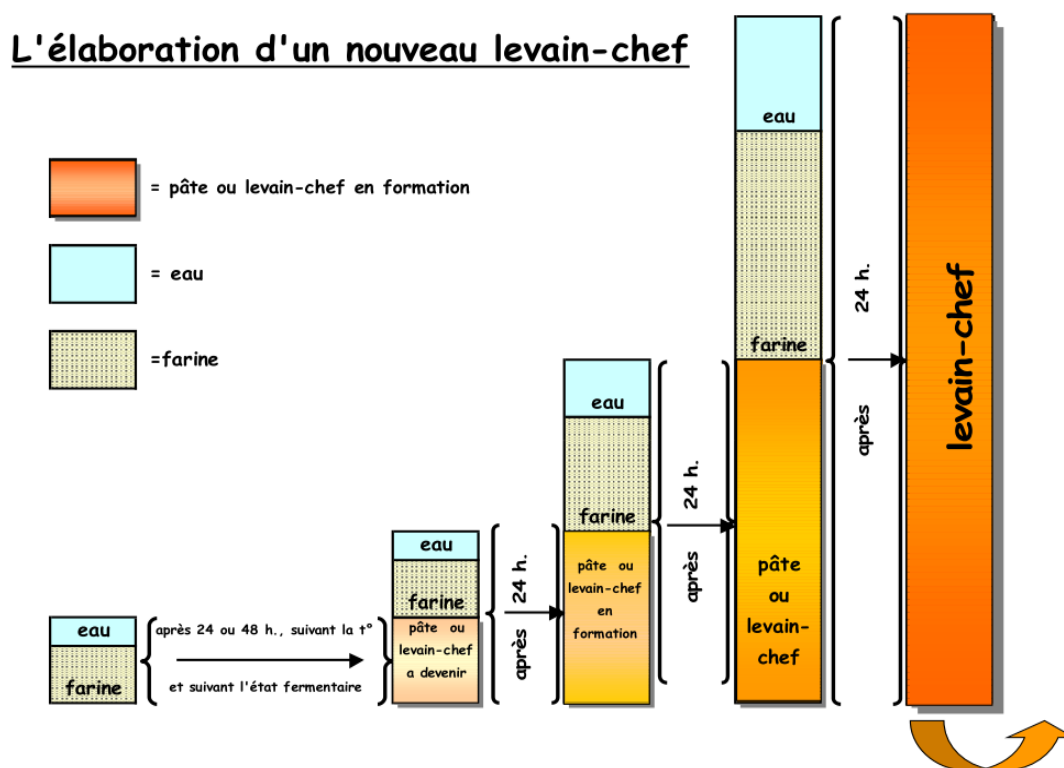


Figure 11 : Elaboration d'un nouveau levain-chef (figure fournie amicalement par Philippe Roussel)

À partir du « levain chef » initial (exemple Figure 10, reste de pâte ou de levain de la fournée précédente), auquel on fait subir un à sept « rafraichis » (ajout de farine et d'eau) sur 12 h à plusieurs jours, on obtient le levain « tout point » (« final leavened dough »). Celui-ci doit contenir la microflore nécessaire à la levée de la pâte. Deux options sont alors possibles :

- 1) Utiliser uniquement une partie du « levain tout point » comme agent de fermentation de la pâte à pain. Conserver le reste qui deviendra alors le nouveau « levain chef » (option 1 de la Figure 10) ;

- 2) Utiliser la totalité du « levain tout point » comme agent de fermentation de la pâte à pain. Récupérer un reste de pâte à pain après la pétrissée qui deviendra alors le nouveau « levain chef » (option 2 de la Figure 10).

La préparation de la pâte à pain requiert : de la farine, de l'eau, du sel et du levain. Le pourcentage de levain par rapport à la quantité de pâte finale varie d'un boulanger à l'autre. Après le pétrissage, la pâte subit un premier temps de repos : le « pointage ». La pâte est ensuite divisée : c'est le « boulage », avant d'être façonnée. Les pains reposent lors d'une seconde période, nommée l'« apprêt », avant la cuisson (Calvel 1990 ; Granier 2003).

Le pain au levain a un goût acide caractéristique, particulièrement au niveau de la mie. Comparativement à du pain fermenté à la levure seule, l'utilisation de levain améliore les qualités sensorielles du produit final (Gobbetti 1998 ; Hansen & Schieberle 2005 ; Martinez-Anaya *et al.*, 1990 ; Messens & De Vuyst 2002 ; Yousif & Safaa 2014). Le pain au levain se conserve plus longtemps qu'un pain à la levure et est plus digeste (Rizzello *et al.*, 2009 ; Sabir *et al.*, 2013). Le pH est particulièrement bas dans le pain au levain (3.9 à 5 versus pain fermenté à la levure 5.6 à 5.9, communication personnelle Chiron & Onno) de par la production dans la pâte d'acide lactique (2 000 à 7 000 mg/kg dans le pain au levain ; environ 100 dans le pain à la levure) et acétique (500 à 1 900 mg/kg dans le pain au levain ; environ 100 dans le pain à la levure) (communication personnelle Chiron & Onno). La législation française impose certaines règles à l'appellation de pain "au levain". Il doit s'agir à la fois d'un « pain maison » (pain pétri, façonné et cuit sur un même lieu) et d'un « pain de tradition française » (pas de surgélation au cours de l'élaboration; ne contenant aucun additif, résultant de la cuisson d'une pâte composée de farines panifiables de blé, d'eau potable et de sel de cuisine; fermenté à la levure et au levain) dont le pH est au maximum de 4.3 et la teneur en acide acétique endogène de la mie d'au moins 900 mg/kg (Décret n°93-1074 du 13 septembre 1993 pris pour l'application de la loi du 1er août 1905 en ce qui concerne certaines catégories de pains). La législation française autorise le « pain de tradition française au levain » à un apport de 0.2% (0.2g de levure pour 100g de farine) de levure par rapport au poids de la farine dans la pétrissée finale.

Le pain au levain peut être réalisé à partir de différentes farines, notamment de blé et/ou de seigle. Le levain doit être adapté à la farine de panification : la même farine est généralement utilisée pour le maintien du levain et la pâte à pain. En Europe du Nord et centrale, l'utilisation d'un levain de seigle est primordiale pour obtenir une texture de pain légèrement aérée car la production de pain se fait principalement à partir de farine de seigle (Hansen & Schieberle 2005). Alors qu'en France comme dans le reste des pays méditerranéens, du Moyen Orient ou encore dans la baie de San

Francisco, le levain de blé est préférentiellement produit pour panifier des pains produits à partir de farine de blé.

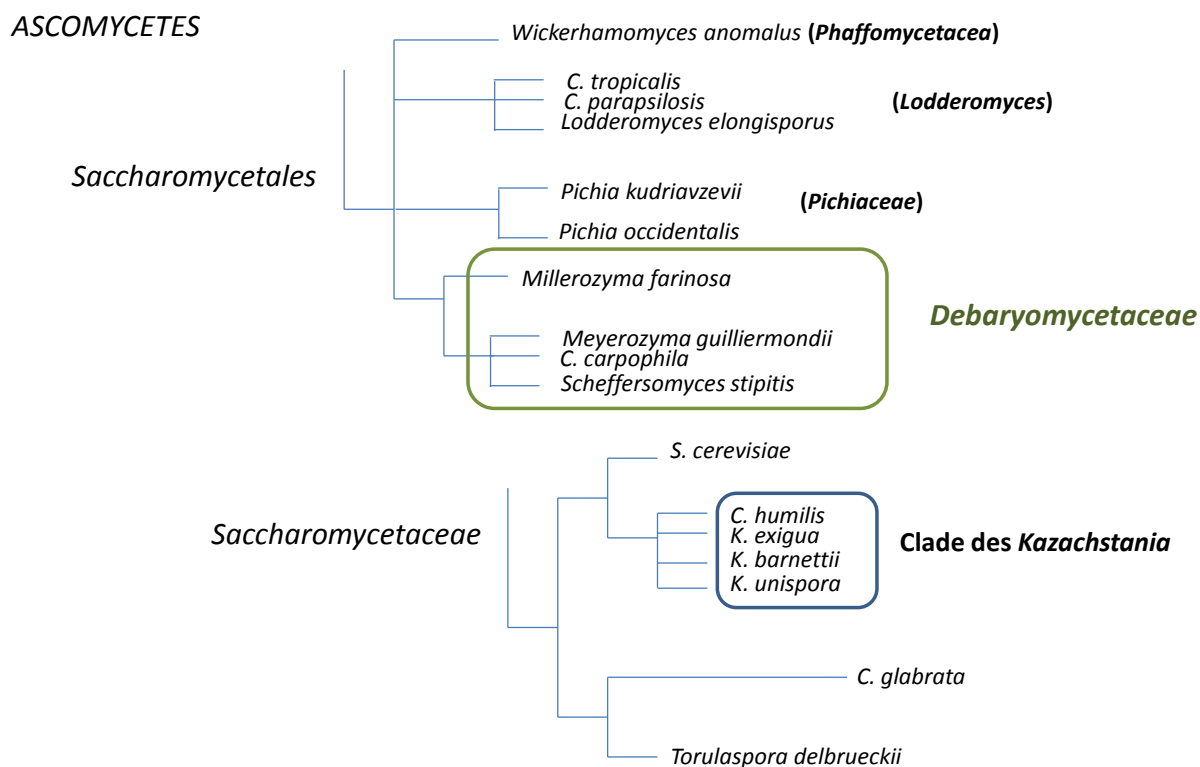
## 5.2. La levure dans la fermentation au levain

### 5.2.1. Levures préalablement isolées dans les levains

Comme nous l'avons vu précédemment, les microorganismes d'un milieu donné interagissent à travers différents phénomènes (interactions biologiques). Lors de l'élaboration du levain, la communauté microbienne se met en place: les espèces et souches adaptées aux conditions abiotiques du milieu se développent. De plus, certaines espèces sont exclues du milieu via le phénomène de compétition pour les ressources. La microflore des levains a été étudiée dans au moins 19 pays dont 11 européens via plus de 100 publications (d'après De Vuyst *et al.*, 2014). Dans la littérature, la diversité des LAB est globalement mieux décrite que celle des levures. En effet, plus de la moitié des publications associées à la diversité des communautés microbiennes des levains ne décrivent que les LAB et parmi l'autre moitié, seulement 50% déterminent l'espèce de levure par des méthodes moléculaires (grâce notamment au séquençage de la région *D1/D2* de l'ADN ribosomique). Or, on sait aujourd'hui que la description des espèces de levures par méthode phénotypique n'est pas suffisante. Enfin, l'étude de la diversité des espèces de levures, lorsqu'elle a lieu, est très succincte: seuls 2 à 10 isolats par levain sont généralement caractérisés. Quand on sait que la densité de cellules de levures varie de :  $10^2$  à  $10^7$  cellules par gramme de levain, on peut facilement imaginer que certaines espèces, minoritaires, n'ont pas encore été identifiées.

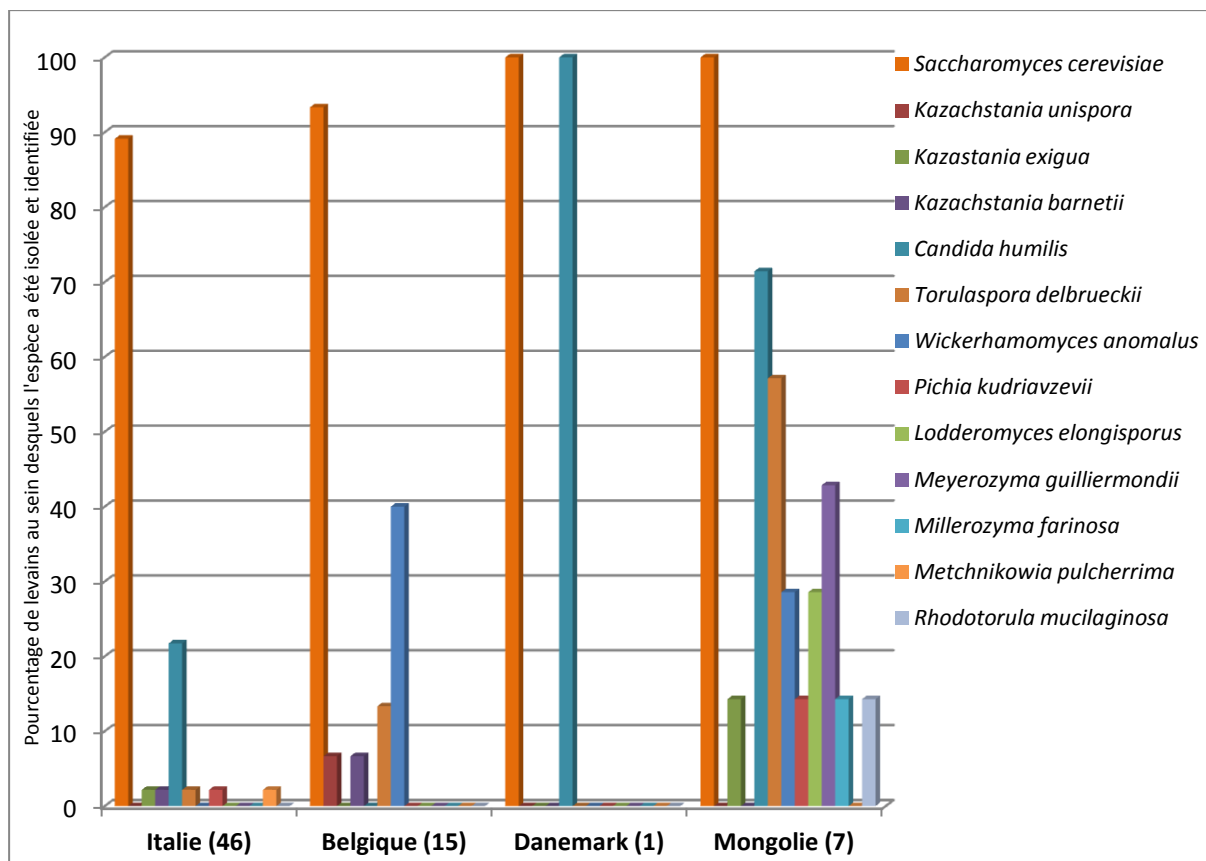
Au total, au moins 18 espèces de levures ont été identifiées moléculairement dans des levains de blé ou de mélange blé et seigle (levains naturels avec/sans ajout de starter): *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida humilis* (ou *C. milleri*), *C. glabrata*, *Kazachstania barnettii*, *K. exigua*, *K. unispora*, *Torulaspora delbrueckii*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Pichia kudriavzevii*, *C. parapsilosis*, *Lodderomyces elongisporus*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Millerozyma farinosa*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *C. tropicalis*, *P. occidentalis*, *C. carpophila* et *Scheffersomyces stipitis* (Gobbetti 1998 ; Gobbetti *et al.*, 1994b ; Gullo *et al.*, 2003 ; Kline & Sugihara 1971 ; Luangsakul *et al.*, 2009 ; Mantynen *et al.*, 1999 ; Meroth *et al.*, 2003 ; Minervini *et al.*, 2012 ; Moroni *et al.*, 2011 ; Nuobariene *et al.*, 2012 ; Palomba *et al.*, 2011 ; Pulvirenti *et al.*, 2001 ; Rocha & Malcata 2012 ; Rosenquist & Hansen 2000 ; Scheirlinck *et al.*, 2007 ; Sugihara *et al.*, 1971 ; Valmorri *et al.*, 2006 ; Valmorri *et al.*, 2010 ; Venturi *et al.*, 2012 ; Vernocchi *et al.*, 2004 ; Vogelmann *et al.*, 2009 ; Vrancken *et al.*, 2010 ; Zhang *et al.*, 2011, Figure 12).





**Figure 12:** Taxonomie des espèces isolées de levain de blé ou de blé et seigle, adaptation de Kurtzman *et al.*, 2011.

Certains des levains décrits dans la littérature scientifique ont été initiés au laboratoire, d'autres avec ajout de starter ou sur farine de seigle uniquement. Au final, relativement peu d'études concernent les levains naturels de blé (sans ajout de starter). Il s'agit de levains d'Europe (Danemark, Allemagne, Belgique, Italie) et de Mongolie (Gullo *et al.*, 2003 ; Minervini *et al.*, 2012 ; Nuobariene *et al.*, 2012 ; Palomba *et al.*, 2011 ; Scheirlinck *et al.*, 2007 ; Valmorri *et al.*, 2006 ; Valmorri *et al.*, 2010 ; Vrancken *et al.*, 2010 ; Zhang *et al.*, 2011). Enfin, il existe des spécificités d'initialisation et de maintien du levain ou du processus de panification au sein de chaque pays. Par exemple, les levains de Belgique sont principalement produits à partir d'un mélange de farine de blé et de seigle. En Allemagne, un starter est généralement ajouté au levain pour la panification. Sur un échantillon de 69 levains naturels (sans ajout de starter) de blé ou de blé et seigle étudié, 13 espèces ont été identifiées (Figure 13). Dans la majorité des levains de blé ou de blé et seigle, on trouve l'espèce *S. cerevisiae*. En Italie, au Danemark et en Mongolie, l'espèce que l'on retrouve dans le plus de levains est ensuite *C. humilis*, alors qu'il s'agit de *W. anomalus* dans les levains belges. Dans chaque levain, le nombre d'espèces de levures identifiées est faible (une à deux espèces par levain).



**Figure 13:** Pourcentage de levain de blé ou de blé et seigle dans lequel chaque espèce de levure a été identifiée. Le nombre de levains analysés par pays est noté entre parenthèses (d'après Gullo *et al.*, 2003 ; Minervini *et al.*, 2012 ; Nuobariene *et al.*, 2012 ; Palomba *et al.*, 2011 ; Scheirlinck *et al.*, 2007 ; Valmorri *et al.*, 2006 ; Valmorri *et al.*, 2010 ; Vrancken *et al.*, 2010 ; Zhang *et al.*, 2011). Ordonnée : pourcentage de levains qui contiennent chaque espèce.

### 5.2.2. Propriétés des levures dans les levains naturels

Nous avons vu précédemment l'importance de la flore microbienne associée aux produits fermentés pour obtenir les propriétés organoleptiques et de conservation recherchées. La levure agit sur la saveur du pain via la production d'alcool ou d'enzymes (invertase), est source de vitamines (B et D notamment) et affecte la texture de la mie (Sakharkar & Sakharkar 2009).

Les levures, en augmentant la disponibilité de certains acides aminés, stimulent la croissance de LAB ainsi que leur propre croissance (Gobbetti *et al.*, 1994a). L'activité de l'invertase des levures permet l'hydrolyse du sucrose en fructose et glucose (Brock & Madigan 1991). En produisant du fructose, les levures favorisent encore certaines espèces de LAB. Le glucose est directement métabolisable par la levure. D'autre part, les souches de levures et de bactéries peuvent être en compétition pour l'azote du milieu (Gobbetti *et al.*, 1994a). Ces interactions sont souches-dépendantes. Des interactions de type compétition entre les espèces de levures dans des levains créés en laboratoire ont été mises en évidence (Meroth *et al.*, 2003 ; Vogelmann *et al.*, 2009).

### 5.2.3. Paramètres influençant la diversité et la densité des levures dans les levains

Les levures agissent sur les propriétés de la pâte et du pain mais subissent de fortes pressions biotiques et abiotiques au cours du processus de panification. Certains paramètres comme la température de fermentation, la farine utilisée ou la quantité de sel ajoutée au cours du processus de panification sont connus pour avoir un impact sur la diversité et/ou la densité des levures.

Les paramètres suivants ont préalablement été décrits dans la littérature comme des facteurs influençant la diversité, la densité ou la valeur sélective des levures dans les levains :

- **La farine.** Des productions de levain en laboratoire ont montré que, dans certaines conditions de fermentation, l'espèce de céréale de la farine avait un effet sur la densité des levures ainsi que sur les espèces identifiées dans le levain (Moroni *et al.*, 2011 ; Vogelmann & Hertel 2011). La densité de levures semble plus faible dans les levains de blé que dans les levains de seigle dans des conditions particulières : à une température de fermentation de 37°C, dans des levains inoculés avec un starter contenant *Issatchenkia orientalis*, *Lactobacillus reuteni* et *L. johnsonii*, avec un pourcentage de levain de 10% lors des rafraichis effectués toutes les 24h, six fois (Vogelmann & Hertel 2011). Une étude menée sur des levains sans gluten a montré que la densité de levures était plus élevée dans les levains de farine de teff que dans les levains de farine de sarrasin (Moroni *et al.*, 2011). La composition en espèces s'est également révélée différente entre les levains sans gluten (Moroni *et al.*, 2011). L'effet de la farine sur la composition en espèce et la densité des levures est à confirmer avec un plus large échantillon de levains testés et des réplicats de levains. De plus, une étude menée sur 11 levains produits à partir de farines issues de céréales différentes (blé, seigle, avoine, orge, riz, maïs, millet, amarante, sarrasin et cassava) et inoculés avec un mélange connu de starters a montré que la compétitivité des espèces de levures dépendait de la farine (Vogelmann *et al.*, 2009). L'espèce *S. cerevisiae*, majoritaire dans le mélange initialement inoculé, était la seule espèce détectée en fin de fermentation sur levain de blé alors que *I. orientalis* (dans les levains de maïs et de quinoa) et *C. glabrata* (dans le levain d'amarante) ont été également détectées dans d'autres levains (Vogelmann *et al.*, 2009). L'effet de l'utilisation de farine produite à partir de seigle issus de l'Agriculture Biologique a été testé et révèle une composition en espèces identique mais des différences génotypiques intraspécifiques entre les deux levains, lors des trois premiers mois d'existence du produit (Rosenquist & Hansen 2000).

- **La température de fermentation.** La densité des levures est affectée par la température : dans des levains de seigle préparés au laboratoire et inoculés avec les espèces *Candida humilis* et *L. sanfranciscensis*, la densité est maximale entre 25 et 28 °C puis diminue lorsque la température de fermentation augmente (Brandt *et al.*, 2004). Dans des levains d'un mélange blé et seigle préparés au laboratoire et inoculés avec un starter commercial, la densité des levures croît avec l'augmentation des températures de fermentation entre 15 et 27 °C (Simonson *et al.*, 2003). Lors de l'élaboration d'un levain de blé au laboratoire, la température de fermentation semble affecter la densité des levures : elles sont non détectées au cours des premiers rafraichis à 37 °C et présentent une densité plus faible à 23 °C qu'à 30 °C lors des premiers rafraichis (Vrancken *et al.*, 2011). La densité est plus faible à 40 °C qu'à 30 °C (Meroth *et al.*, 2003). De plus, la température de fermentation a un impact sur les espèces de la façon suivante: *I. orientalis* croît d'avantage à 25 et 27 °C qu'à 40 °C alors que *C. humilis* est trouvée en plus grande densité à 25 °C qu'à 30 °C (Vogelmann & Hertel 2011), *C. krusei* croît à 40 °C (Meroth *et al.*, 2003). Enfin, la température de fermentation affecte la compétitivité des espèces : l'association *C. humilis* et *L. sanfranciscensis* gagne la compétition contre *S. cerevisiae* et *L. plantarum* à 20 °C (Vogelmann & Hertel 2011).
- **La fréquence des rafraichis.** Avec des rafraichis toutes les 12 heures plutôt que toutes les 24 heures, l'espèce *C. humilis* est présente en plus grande densité que *S. cerevisiae*, sur des levains inoculés respectivement avec l'une ou l'autre des espèces (Vogelmann & Hertel 2011). De plus, *I. orientalis* est favorisée par des rafraichis fréquents (Vogelmann & Hertel 2011).
- **Le pourcentage de levain comme inoculum de la pâte.** Une corrélation positive a été démontrée entre la densité des levures et le pourcentage de levain comme inoculum dans des levains naturels de produits de panification sucrés (Lattanzi *et al.*, 2013). De plus, des tests en laboratoire sur des levains inoculés avec *C. humilis* et *L. sanfranciscensis* ont mis en évidence qu'un pourcentage d'inoculum supérieur à 2% favorisait d'avantage la croissance des levures que celle des LAB (Brandt *et al.*, 2004).
- **L'ajout de levure commerciale.** Dans des levains naturels, la densité des levures est plus élevée lorsqu'il y a ajout de levure commerciale (Minervini *et al.*, 2012).
- **La quantité de sel.** Le sel a un effet inhibiteur sur la croissance des levures : Simonson *et al.* (2003) ont montré que la densité des levures diminuait lorsque la concentration en sel augmentait de 0 à 3.2 %. Cette étude a été réalisée sur des levains de blé en présence majoritairement de *C. milleri* (très proche de *C. humilis*).

- **La « house microbiota ».** Il s'agit là d'un effet de l'environnement boulanger. La densité des levures s'est révélée plus faible dans des levains produits en laboratoire que dans des levains naturels (Minervini *et al.*, 2012). La comparaison de la diversité des espèces isolées de levains a également mis en évidence une différence de composition en espèces en fonction du milieu (laboratoire/fournil), qui serait due à l'impact de l'environnement de production du levain : la « house microbiota » (Vrancken *et al.*, 2010). Cet effet devrait être vérifié par des analyses complémentaires.

À ce jour, à notre connaissance, aucun effet du pH, de la saison (chaude, froide), de la variété et du terroir d'origine du blé ou encore de la région de production n'a été mis en évidence. De plus, bien qu'ils n'aient pas été testés rigoureusement, certains effets sont supposés avérés par la communauté scientifique : c'est le cas de l'utilisation de « levure de boulanger », *S. cerevisiae*. Cette espèce envahirait la communauté microbienne lorsqu'elle est utilisée dans le fournil pour un autre produit de panification (Corsetti *et al.*, 2001 ; De Vuyst *et al.*, 2014 ; Meroth *et al.*, 2003 ; Pulvirenti *et al.*, 2001 ; Succi *et al.*, 2003 ; Vernocchi *et al.*, 2004 ; Vrancken *et al.*, 2010).

Finalement, les levains décrits dans la littérature présentent une communauté stable de microorganismes présentant une faible richesse spécifique de levures (Gullo *et al.*, 2003 ; Lattanzi *et al.*, 2013 ; Minervini *et al.*, 2012a ; Minervini *et al.*, 2012b ; Scheirlinck *et al.*, 2007 ; Valmorri *et al.*, 2010 ; Venturi *et al.*, 2012).

## 6. Problématique et plan de la thèse

Au cours de cette introduction, nous avons pu mettre en évidence l'importance de la production de produits fermentés à travers le monde et particulièrement de la fermentation du blé pour produire du pain au levain. Les connaissances sur la composition microbienne des levains naturels sont particulièrement restreintes en France et portent principalement sur les LAB (Amari *et al.*, 2012 ; Amari *et al.*, 2013 ; Ferchichi *et al.*, 2007 ; Ferchichi *et al.*, 2008 ; Laguerre *et al.*, 2012 ; Robert *et al.*, 2009 ; Valcheva *et al.*, 2005 ; Valcheva *et al.*, 2006 ; Vera *et al.*, 2012). Malgré l'importance culturelle et nutritionnelle du pain français, la diversité des levures présentes dans les levains naturels n'a été que peu décrite.

## 6.1 Objectifs

L'objectif de ma thèse était de décrire les espèces de levures, dans les levains naturels français. Nous avons choisi d'analyser la diversité des espèces des levures de levains produits à partir de farine de blé ou d'un mélange blé et seigle, issue de l'Agriculture Biologique car ce type d'agriculture limite le nombre d'intrants chimiques et pourrait contribuer à conserver la biodiversité et notamment la micro-biodiversité dans les parcelles au champ. Durant cette thèse, nous avons identifié génétiquement et effectué une caractérisation phénotypique des souches microbiennes provenant de levains produits par des boulangers et des paysans-boulangers français.

Les paysans-boulangers sont des paysans qui produisent leur blé et mènent, une à trois fois par semaine, une activité de panification à partir de leur propre farine. Ces artisans possèdent généralement un moulin à la ferme qui leur permet de moudre le grain de blé sur place. Certains paysans-boulangers ayant participé à cette étude font partie d'un réseau d'agriculteurs : le réseau semences paysannes (RSP, [www.semencespaysannes.org/](http://www.semencespaysannes.org/)), particulièrement impliqué en France dans la conservation de la biodiversité et engagé à promouvoir la diversité des espèces cultivées.

Outre la description des populations de levures dans les levains, mon travail s'inscrit, à plus large échelle, dans un but de conservation à la fois statique (grâce à la conservation *ex situ*) et dynamique (grâce à la conservation *in situ*) des souches de levures.

Dans le cadre de la conservation *ex situ*, les souches sont conservées au laboratoire ou en collection, au CIRM-Levures par exemple. Ce mode de conservation a pour avantage de nécessiter relativement peu d'espace et de faciliter l'accessibilité aux souches. Cependant, la conservation *ex situ* ne permet pas de conserver l'ensemble de la diversité microbienne d'une population, compte tenu du nombre limité de souches conservées. De plus, le matériel génétique conservé dans les banques subit un « gel évolutif » (Esquinas-Alcázar 2005) : les souches sont récupérées à un instant *t*, ce qui implique qu'elles ne subissent plus les phénomènes de sélection naturelle du milieu d'origine. Enfin, les données collectées en même temps que les souches sont souvent pauvres et le travail de synthèse sur l'ensemble des collections reste à faire, ce qui ne favorise pas la valorisation de ces ressources génétiques.

La conservation *in situ* des ressources génétiques consiste à gérer les ressources génétiques sous forme de populations maintenues dans l'environnement où leur diversité est apparue et où elle a évolué (UNCED, 2000). Il s'agit d'une gestion dynamique de la diversité, prenant en compte l'adaptation continue des populations à leur environnement et à ses changements (Brush 1991). La gestion dynamique regroupe deux approches : la gestion de populations hétérogènes, généralement

mise en place par les instituts de recherche ; et la gestion de populations chez les agriculteurs/artisans. Cette dernière approche permet de combiner la sélection humaine et l'adaptation des populations à des environnements différents, tout en maintenant la variabilité génétique au sein des populations (Elias *et al.*, 2001). La conservation *in situ* doit en effet prendre en compte l'environnement biotique et abiotique des organismes.

À notre connaissance, un seul programme de conservation *ex situ* de la diversité microbienne liée au processus de boulangerie a été mis en place, en Belgique. Aucun programme de gestion *in situ* des microorganismes du levain n'a été mis en place, la diversité microbienne restant à ce jour peu décrite et méconnue des boulangers qui maintiennent les levains.

Afin de caractériser la diversité spécifique et de conserver à la fois *in situ* et *ex situ* la richesse spécifique des levures des levains naturels français, j'ai étudié les populations de levures présentes au cours du processus de panification de pains dits « de tradition française » produits à partir de farine issue de l'Agriculture Biologique et sans ajout de ferment commercial. Quatorze boulangers et paysans-boulangers ont participé à cette étude. L'échantillonnage a été conçu pour maximiser la couverture géographique et représenter des pratiques boulangères variées (boulangers et paysans/boulangers, différents volumes de pain produits, différentes températures de conservation du levain chef, âge varié du levain chef,...). Afin de décrire la diversité des espèces de levures des levains, des approches de microbiologie classique, de pyroséquençage 454 d'amplicons et des analyses phénotypiques ont été employées.

## 6.2 Questions posées

Au cours de ma thèse, pour décrire la diversité des espèces de levures dans les levains naturels français, j'ai cherché à répondre à différentes questions :

- La communauté microbienne du levain est-elle stable au cours du processus de panification et d'une panification à une autre chez un même boulanger?
- La diversité spécifique des levures des levains est-elle représentative lorsqu'elle est décrite par les méthodes de microbiologie classique ou est-ce que les méthodes non culturales, comme le pyroséquençage 454 d'amplicons, permettent de détecter d'autres espèces?
- Quelle est la diversité des pratiques des boulangers?

- Peut-on détecter des facteurs qui structurent la diversité spécifique des levures des levains en France? En particulier, peut-on mettre en regard la diversité des espèces à des différences de pratiques boulangères ou la distribution spatiale des fournils?
- Quelle est la diversité phénotypique des souches isolées des levains français entre elles et par rapport à des souches de référence issues d'autres environnements?

Dans la suite de ce manuscrit, je présenterai le matériel recueilli et les méthodes utilisées (chapitre 1) et les résultats de mon travail en trois chapitres (chapitre 2, 3 et 4) puis, je discuterai mes résultats et présenterai les perspectives (discussion).

Le chapitre 2 porte sur la stabilité des communautés microbiennes (levures et bactéries lactiques) au cours du processus de panification. Ce travail a été réalisé en collaboration et en parallèle du travail effectué par Emilie Lhomme (doctorante au laboratoire ONIRIS, Nantes) sur la diversité des LAB des levains. Pour cela, des échantillons de pâtes à pain et de levains de cinq fournils produisant du pain à partir de farine issue de l'Agriculture Biologique ont été analysés par méthode culturale. Au total, 1 675 souches et dix espèces de levures ont été identifiées. Ce travail a mis en évidence la relative stabilité de la composition de la communauté microbienne au cours du temps et la grande variation de la densité des levures et LAB. Il a également permis de choisir un point de prélèvement (le "levain tout point") pour étendre l'analyse de la diversité des microorganismes à davantage de levains et étudier les patrons de diversité des communautés microbiennes selon différents facteurs (pratiques, distribution spatiale).

Le chapitre 3 porte sur la diversité des communautés de levures de 14 levains « tout point » produits à partir de farine issue de l'agriculture biologique et collectés sur l'ensemble du territoire français. Une méthode d'identification des champignons des levains par pyroséquençage de la région ITS1 de l'ADNr a été développée, s'affranchissant des méthodes culturales. Les résultats ont été comparés à une analyse culturale de la diversité des levures sur les mêmes levains. Au total, 519 souches de levures et 206 186 séquences d'amplicons ont été analysées. L'ordre des *Saccharomycetales* représente 63 % des séquences identifiées par méthode non culturale. Les résultats concernant l'espèce majoritaire de chaque levain sont similaires entre les deux méthodes. Enfin, cette étude montre la prépondérance du genre *Kazachstania* dans les levains naturels français produits à partir de farine issue de l'Agriculture Biologique.



Enfin, le chapitre 4 porte sur la diversité des pratiques de panification dans 14 fournils, leur lien avec la diversité microbienne et les caractéristiques biochimiques des levains associés ainsi que sur la description phénotypique de 35 souches de levures.

Deux typologies de pratiques ont été mises en évidence: un groupe composé majoritairement de paysans-boulangers, menant peu de journées de panification par semaine, majoritairement avec de la farine moulue sur place et issue de variétés anciennes ou mixtes, avec un pétrissage de la pâte à la main ; un groupe composé uniquement de boulangers, ayant généralement plus de cinq journées de panification par semaine avec de la farine, mixte ou de variétés modernes, moulue par un meunier extérieur au fournil et pour lesquels le pétrissage sera plus souvent mécanique. Les pratiques ont un effet sur l'espèce majoritaire : *C. humilis* domine, dans 67 % des cas (contre 0 %), les populations de levures des fournils du second groupe.

Pour le phénotypage, 35 souches provenant des sept espèces majoritairement identifiées dans les levains français étudiés au cours de cette thèse (*C. humilis*, *K. bulderi*, *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii*, *K. barnettii*, *K. exigua* et *K. unispora*) ont été caractérisées. Quatre espèces ont particulièrement été décrites :

- *Candida humilis* et *S. cerevisiae* car elles sont communément décrites dans les levains naturels et vendues dans les levains commerciaux ;
- *Kazachstania bulderi* car elle a été nouvellement isolée dans plusieurs levains naturels français au cours de cette thèse ;
- *Torulaspora delbrueckii* car, en plus d'être connue pour présenter des résistances particulières au froid, cette espèce est phylogénétiquement plus éloignée du clade de *S. cerevisiae* que les espèces du clade des *Kazachstania*.

Deux à six souches isolées de levains naturels et une souche de référence de chaque espèce ont été caractérisées pour : leur niveau de ploïdie, les profils d'assimilation de sucres, la croissance en milieu anaérobie et sur milieu minimum, la sporulation et la taille des cellules. Des variations de taille de la cellule, de ploïdie et de profil d'assimilation des sucres ont été mises en évidence au sein d'une espèce et entre espèces. Toutes les souches isolées de levain assimilaient le saccharose et le raffinose.

## Bibliographie

- Abee, Tjakko, Lothar Krockel, et Colin Hill. 1995. « Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning ». *International Journal of Food Microbiology*, Physiology of Food Poisoning Microorganisms, AAIR Concerted Action PL920630, 28 (2): 169-85. doi:10.1016/0168-1605(95)00055-0.
- Adams, Martin, et Robert Mitchell. 2002. « Fermentation and pathogen control: a risk assessment approach ». *International journal of food microbiology* 79 (1): 75-83.
- Adams, Martin R., et Linda Nicolaides. 1997. « Review of the sensitivity of different foodborne pathogens to fermentation ». *Food control* 8 (5): 227-39.
- Agbor Egbe, T., I.L. Mbome, L. Noubi, et Serge Trèche. 1995. « The Effectiveness of Cyanogen Reduction during Cassava Processing into Miondo = Efficacité de La Diminution Des Composés Cyanés Lors de La Transformation Du Manioc En Miondo ». In *Transformation Alimentaire Du Manioc = Cassava Food Processing*. 307-18.
- Albertin, W., P. Marullo, M. Aigle, A. Bourgaïs, M. Bely, C. Dillmann, D. De Vienne, et D. Sicard. 2009. « Evidence for Autotetraploidy Associated with Reproductive Isolation in *Saccharomyces Cerevisiae*: Towards a New Domesticated Species ». *Journal of Evolutionary Biology* 22 (11): 2157-70. doi:10.1111/j.1420-9101.2009.01828.x.
- Ali, Akbar, Aamir Shehzad, Moazzam Rafiq Khan, Muhammad Asim Shabbir, et Muhammad Rizwan Amjid. 2012. « Yeast, its types and role in fermentation during bread making process-A ». *Pakistan Journal of Food Sciences* 22 (3): 171-79.
- Amari, Myriam, Luisa Fernanda Gomez Arango, Valerie Gabriel, Herve Robert, Sandrine Morel, Claire Moulis, Bruno Gabriel, Magali Remaud-Simeon, et Catherine Fontagne-Faucher. 2013. « Characterization of a Novel Dextranucrase from *Weissella Confusa* Isolated from Sourdough ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (12): 5413-22. doi:10.1007/s00253-012-4447-8.
- Amari, Myriam, Sandrine Laguerre, Marlène Vuillemin, Hervé Robert, Valentin Loux, Christophe Klopp, Sandrine Morel, et al. 2012. « Genome Sequence of *Weissella Confusa* LBAE C39-2, Isolated from a Wheat Sourdough ». *Journal of Bacteriology* 194 (6): 1608-9. doi:10.1128/JB.06788-11.
- Anaissie, Elias J., Michael R. McGinnis, et Michael A. Pfaller. 2009. *Clinical Mycology*. Elsevier Health Sciences.
- Aquilanti, Lucia, Sara Santarelli, Gloria Silvestri, Andrea Osimani, Annalisa Petruzzelli, et Francesca Clementi. 2007. « The Microbial Ecology of a Typical Italian Salami during Its Natural Fermentation ». *International Journal of Food Microbiology* 120 (1-2): 136-45. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.010.
- Ashenafi, Mogessie. 1994. « Microbial flora and some chemical properties of ersho, a starter for teff (*Eragrostis tef*) fermentation ». *World journal of Microbiology and Biotechnology* 10 (1): 69-73.

- Barnard, Hans, Alek N. Dooley, Gregory Areshian, Boris Gasparyan, et Kym F. Faull. 2011. « Chemical Evidence for Wine Production around 4000 BCE in the Late Chalcolithic Near Eastern Highlands ». *Journal of Archaeological Science* 38 (5): 977-84. doi:10.1016/j.jas.2010.11.012.
- Barth, F. 2013. « Economic Spheres in Darf'ur1 ». *Themes in economic anthropology*, 149.
- Battcock, Mike, et Sue Azam-Ali. 1998. « Fermented fruits and vegetables. A global perspective. »  
FAO Agriculture services bulletin N°134.  
<http://www.fao.org/docrep/x0560e/x0560e00.htm>.
- Berkowitz, J. E., P. Coggon, et G. W. Sanderson. 1971. « Formation of epigallocatechin gallate and its transformation to thearubigins during tea fermentation ». *Phytochemistry* 10 (10): 2271-78.
- Bing, Jian, Pei-Jie Han, Wan-Qiu Liu, Qi-Ming Wang, et Feng-Yan Bai. 2014. « Evidence for a Far East Asian origin of lager beer yeast ». *Current Biology* 24 (10): R380-81.
- Birch, Anja N., Mikael A. Petersen, Nils Arneborg, et Åse S. Hansen. 2013. « Influence of commercial baker's yeasts on bread aroma profiles ». *Food Research International* 52 (1): 160-66. doi:10.1016/j.foodres.2013.03.011.
- Birch, Anja N., Mikael A. Petersen, et Åse S. Hansen. 2013. « The aroma profile of wheat bread crumb influenced by yeast concentration and fermentation temperature ». *LWT - Food Science and Technology* 50 (2): 480-88. doi:10.1016/j.lwt.2012.08.019.
- Bisping, B., L. Hering, U. Baumann, J. Denter, S. Keuth, et H. J. Rehm. 1993. « Tempe fermentation: Some aspects of formation of  $\gamma$ -linolenic acid, proteases and vitamins ». *Biotechnology advances* 11 (3): 481-93.
- Bleicher, Anne, Tanja Obermajer, Bojana Bogovič Matijašić, Siegfried Scherer, et Klaus Neuhaus. 2010. « High Biodiversity and Potent Anti-Listerial Action of Complex Red Smear Cheese Microbial Ripening Consortia ». *Annals of Microbiology* 60 (3): 531-39. doi:10.1007/s13213-010-0083-7.
- Boulton, Christopher, et David Quain. 2008. *Brewing Yeast and Fermentation*. John Wiley & Sons.
- Bourdichon, François, Serge Casaregola, Chereh Farrokh, Jens C. Frisvad, Monica L. Gerds, Walter P. Hammes, James Harnett, et al. 2012. « Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use ». *International Journal of Food Microbiology* 154 (3): 87-97. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.030.
- Brandt, M. J., W. P. Hammes, et M. G. Ganzle. 2004. « Effects of Process Parameters on Growth and Metabolism of *Lactobacillus sanfranciscensis* and *Candida humilis* during Rye Sourdough Fermentation ». *European Food Research and Technology* 218 (4): 333-38. doi:10.1007/s00217-003-0867-0.
- Brock, Thomas D., et Michael T. Madigan. 1991. *Biology of Microorganisms*. 6th Edition. Upper Saddle River, NJ Hardcover: Prentice Hall. <http://www.abebooks.com/Biology-Microorganisms-6th-Edition-Brock-Thomas/780911915/bd>.
- Brune, M., Rossander-Hultén, L., Hallberg, L., Gleerup, A., et Sandberg, As. 1992. « Iron Absorption from Bread in Humans: Inhibiting Effects of Cereal Fiber, Phytate and Inositol Phosphates with Different Numbers of Phosphate Groups. » *The Journal of Nutrition* 122 (3): 442-49.

- Brush, Sb. 1991. « A Farmer-Based Approach to Conserving Crop Germplasm ». *Economic Botany* 45 (2): 153-65. doi:10.1007/BF02862044.
- Calvel, Raymond. 1990. *Le Gout Du Pain*. Jérôme Villette.
- Campbell, Neil-A., et Jane-B. Reece. 2004. *Biologie*. Édition : 2e édition revue et corrigée. Bruxelles: De Boeck.
- Caplice, Elizabeth, et Gerald F. Fitzgerald. 1999. « Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation ». *International journal of food microbiology* 50 (1): 131-49.
- Chang, H, K Kim, Y Nam, S Roh, M Kim, C Jeon, H Oh, et J Bae. 2008. « Analysis of Yeast and Archaeal Population Dynamics in Kimchi Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis ». *International Journal of Food Microbiology* 126 (1-2): 159-66. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.05.013.
- Choi, H. -J., H. -S. Lee, S. Her, D. -H. Oh, et S. -S. Yoon. 1999. « Partial Characterization and Cloning of Leuconocin J, a Bacteriocin Produced by Leuconostoc Sp. J2 Isolated from the Korean Fermented Vegetable Kimchi ». *Journal of Applied Microbiology* 86 (2): 175-81. doi:10.1046/j.1365-2672.1999.00471.x.
- Cintas, L. M., P. Casaus, L. S. Håvarstein, P. E. Hernández, et I. F. Nes. 1997. « Biochemical and Genetic Characterization of Enterocin P, a Novel Sec-Dependent Bacteriocin from Enterococcus Faecium P13 with a Broad Antimicrobial Spectrum. » *Applied and Environmental Microbiology* 63 (11): 4321-30.
- Clayton, T. Andrew. 2012. « Metabolic differences underlying two distinct rat urinary phenotypes, a suggested role for gut microbial metabolism of phenylalanine and a possible connection to autism ». *FEBS Letters* 586 (7): 956-61. doi:10.1016/j.febslet.2012.01.049.
- Corsetti, A., J. Rossi, et Marco Gobbetti. 2001. « Interactions between yeasts and bacteria in the smear surface-ripened cheeses ». *International journal of food microbiology* 69 (1): 1-10.
- Csoma, H., N. Zakany, A. Capece, P. Romano, et M. Sipiczki. 2010. « Biological Diversity of Saccharomyces Yeasts of Spontaneously Fermenting Wines in Four Wine Regions: Comparative Genotypic and Phenotypic Analysis ». *International Journal of Food Microbiology* 140 (2-3): 239-48. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.024.
- Daniel, Heide-Marie, Gino Vrancken, Jemmy F. Takrama, Nicholas Camu, Paul De Vos, et Luc De Vuyst. 2009. « Yeast Diversity of Ghanaian Cocoa Bean Heap Fermentations ». *FEMS Yeast Research* 9 (5): 774-83. doi:10.1111/j.1567-1364.2009.00520.x.
- Darby, W. J., P. Ghalioungui, et L. Grivetti. 1977. « Food: The Gift of Osiris. Volumes 1 and 2. », lxvi + 877 pp.
- David, Lawrence A., Corinne F. Maurice, Rachel N. Carmody, David B. Gootenberg, Julie E. Button, Benjamin E. Wolfe, Alisha V. Ling, et al. 2014. « Diet Rapidly and Reproducibly Alters the Human Gut Microbiome ». *Nature* 505 (7484): 559-63. doi:10.1038/nature12820.
- De Vuyst, L., et P. Neysens. 2005. « The Sourdough Microflora: Biodiversity and Metabolic Interactions ». *Trends in Food Science & Technology* 16 (1-3): 43-56. doi:10.1016/j.tifs.2004.02.012.

- De Vuyst, L., S. Van Kerrebroeck, H. Harth, G. Huys, H.-M. Daniel, et S. Weckx. 2014. « Microbial Ecology of Sourdough Fermentations: Diverse or Uniform? ». *Food Microbiology* 37 (février): 11-29. doi:10.1016/j.fm.2013.06.002.
- Décret n°93-1074 du 13 septembre 1993. Consulté le 15 Août 2014. Disponible en ligne : <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000000727617>.
- Dismukes, William E., Peter G. Pappas, et Jack D. Sobel. 2003. *Clinical Mycology*. 1 edition. Oxford ; New York: Oxford University Press.
- Drouault, Sophie, et Gérard Corthier. 2001. « Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé ». *Veterinary research* 32 (2): 101-17.
- Dudd, Stephanie N., et Richard P. Evershed. 1998. « Direct Demonstration of Milk as an Element of Archaeological Economies ». *Science* 282 (5393): 1478-81. doi:10.1126/science.282.5393.1478.
- Dupaigne, Bernard. 1999. *History of Bread*. New York: Harry N Abrams.
- Edwards, David N. 1996. « Sorghum, Beer and Kushite society ». *Norwegian Archaeological Review* 29 (2): 65-77. doi:10.1080/00293652.1996.9965599.
- Elias, M., D. McKey, O. Panaud, M. C Anstett, et T. Robert. 2001. « Traditional management of cassava morphological and genetic diversity by the Makushi Amerindians (Guyana, South America): perspectives for on-farm conservation of crop genetic resources ». *Euphytica* 120 (1): 143-57.
- Encinas, Juan-Pablo, Teresa-María López-Díaz, María-Luisa García-López, Andrés Otero, et Benito Moreno. 2000. « Yeast populations on Spanish fermented sausages ». *Meat Science* 54 (3): 203-8.
- Eppert, I., N. Valdés-Stauber, H. Götz, M. Busse, et S. Scherer. 1997. « Growth Reduction of *Listeria* Spp. Caused by Undefined Industrial Red Smear Cheese Cultures and Bacteriocin-Producing *Brevibacterium* Lines as Evaluated in Situ on Soft Cheese. » *Applied and Environmental Microbiology* 63 (12): 4812-17.
- Esquinas-Alcázar, J. 2005. « Protecting crop genetic diversity for food security: political, ethical and technical challenges ». *Nature Reviews Genetics* 6 (12): 946-53.
- Euzéby. 2008. *Grand dictionnaire illustré de parasitologie médicale et vétérinaire*. Lavoisier.
- FAO-CGRFA. 2009. « Scoping study on microorganisms relevant to food and agriculture ». Commission on genetic resources for Food and Agriculture.
- Fardiaz, D., et P. Markakis. 1981. « Degradation of Phytic Acid in Oncom (Fermented Peanut Press Cake) ». *Journal of Food Science* 46 (2): 523-25. doi:10.1111/j.1365-2621.1981.tb04901.x.
- Faria-Oliveira, Fabio, Sonia Puga, et Celia Ferreir. 2013. « Yeast: World's Finest Chef ». In *Food Industry*.
- Fay, J. C, et J. A Benavides. 2005. « Evidence for domesticated and wild populations of *Saccharomyces cerevisiae* ». *PLoS Genet* 1 (1): 66-71.

- Ferchichi, Mounir, Rosica Valcheva, Hervé Prévost, Bernard Onno, et Xavier Dousset. 2007. « Molecular identification of the microbiota of French sourdough using temporal temperature gradient gel electrophoresis ». *Food Microbiology* 24 (7–8): 678-86. doi:10.1016/j.fm.2007.04.001.
- Ferchichi, M., R. Valcheva, N. Oheix, P. Kabadjova, H. Prévost, B. Onno, et X. Dousset. 2008. « Rapid Investigation of French Sourdough Microbiota by Restriction Fragment Length Polymorphism of the 16S-23S rRNA Gene Intergenic Spacer Region ». *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24 (11): 2425-34. doi:10.1007/s11274-008-9763-x.
- Fidalgo, Manuel, Ramon R. Barrales, Jose I. Ibeas, et Juan Jimenez. 2006. « Adaptive Evolution by Mutations in the FLO11 Gene ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (30): 11228-33. doi:10.1073/pnas.0601713103.
- Frank, Daniel N., Allison L. St Amand, Robert A. Feldman, Edgar C. Boedeker, Noam Harpaz, et Norman R. Pace. 2007. « Molecular-Phylogenetic Characterization of Microbial Community Imbalances in Human Inflammatory Bowel Diseases ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (34): 13780-85. doi:10.1073/pnas.0706625104.
- Frasse, P., S. Lambert, D. Richard-Molard, et H. Chiron. 1993. « The Influence of Fermentation on Volatile Compounds in French Bread Dough ». *LWT - Food Science and Technology* 26 (2): 126-32. doi:10.1006/fstl.1993.1027.
- Gaffiot. Dictionnaire. Consulté le 12 Août 2014. Disponible en ligne : <http://www.micmap.org/dicfro/search/gaffiot/fervor>
- Gänzle, Michael G. 2014. « Enzymatic and Bacterial Conversions during Sourdough Fermentation ». *Food Microbiology* 37 (février): 2-10. doi:10.1016/j.fm.2013.04.007.
- Garabal, José I. 2007. « Biodiversity and the survival of autochthonous fermented products ». *International Microbiology* 10 (1): 1-3.
- Garcerá, Maria J. García, Marieke G. L. Elferink, Arnold J. M. Driessen, et Wil N. Konings. 1993. « In Vitro Pore-Forming Activity of the Lantibiotic Nisin ». *European Journal of Biochemistry* 212 (2): 417-22. doi:10.1111/j.1432-1033.1993.tb17677.x.
- Gerbault, Pascale, Mélanie Roffet-Salque, Richard P. Evershed, et Mark G. Thomas. 2013. « How Long Have Adult Humans Been Consuming Milk?: Consumption of Milk and Dairy Products ». *IUBMB Life* 65 (12): 983-90. doi:10.1002/iub.1227.
- Gest, H. 2004. « The Discovery of Microorganisms by Robert Hooke and Antoni van Leeuwenhoek, Fellows of The Royal Society ». *Notes and Records of the Royal Society* 58 (2): 187-201. doi:10.1098/rsnr.2004.0055.
- Gobbetti, M. 1998. « The sourdough microflora: interactions of lactic acid bacteria and yeasts ». *Trends in Food Science & Technology* 9 (7): 267-74.
- Gobbetti, M., A. Corsetti, et J. Rossi. 1994a. « The sourdough microflora. Interactions between lactic acid bacteria and yeasts: metabolism of amino acids ». *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 10 (3): 275-79.

- Gobbetti, M., A. 1994b. « The Sourdough Microflora - Interactions Between Lactic-Acid Bacteria and Yeasts - Metabolism of Carbohydrates ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 41 (4): 456-60.
- Gotelli, N. J., et A. Chao. 2013. « Measuring and estimating species richness, species diversity, and biotic similarity from sampling data. » In *Encyclopedia of biodiversity*, 5:195-211.
- Granier, Henri. 2003. *Apprendre à faire son pain au levain naturel*. Ouest-France. Edilarge S.A.
- Guasch-Jané, Maria Rosa, Cristina Andrés-Lacueva, Olga Jáuregui, et Rosa M. Lamuela-Raventós. 2006. « First evidence of white wine in ancient Egypt from Tutankhamun's tomb ». *Journal of Archaeological Science* 33 (8): 1075-80. doi:10.1016/j.jas.2005.11.012.
- Guasch-Jané, Maria Rosa, Maite Ibern-Gómez, Cristina Andrés-Lacueva, Olga Jáuregui, et Rosa Maria Lamuela-Raventós. 2004. « Liquid Chromatography with Mass Spectrometry in Tandem Mode Applied for the Identification of Wine Markers in Residues from Ancient Egyptian Vessels ». *Analytical Chemistry* 76 (6): 1672-77. doi:10.1021/ac035082z.
- Gullo, M., A.D. Romano, A. Pulvirenti, et P. Giudici. 2003. « *Candida humilis*—dominant species in sourdoughs for the production of durum wheat bran flour bread ». *International Journal of Food Microbiology* 80 (1): 55-59. doi:10.1016/S0168-1605(02)00121-6.
- Hagman, Arne, Torbjörn Säll, Concetta Compagno, et Jure Piskur. 2013. « Yeast "Make-Accumulate-Consume" Life Strategy Evolved as a Multi-Step Process That Predates the Whole Genome Duplication ». *PLoS ONE* 8 (7): e68734. doi:10.1371/journal.pone.0068734.
- Hammes, Walter P., et Petra S. Tichaczek. 1994. « The potential of lactic acid bacteria for the production of safe and wholesome food ». *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* 198 (3): 193-201.
- Hammes, W.P., et M.G. Gänzle. 1998. « 8 sourdough breads and related products ». *Microbiology of fermented foods*, Springer Netherlands, 1: 199.
- Hansen, A., et P. Schieberle. 2005. « Generation of aroma compounds during sourdough fermentation: applied and fundamental aspects ». *Trends in Food Science & Technology*, Second International Symposium on Sourdough - From Fundamentals to Applications Second International Symposium on Sourdough - From Fundamentals to Applications, 16 (1-3): 85-94. doi:10.1016/j.tifs.2004.03.007.
- Hansen, Åse, et Birgit Hansen. 1996. « Flavour of Sourdough Wheat Bread Crumb ». *Zeitschrift Für Lebensmittel-Untersuchung Und Forschung* 202 (3): 244-49. doi:10.1007/BF01263548.
- Hansson, Anne-Marie. 1994. « Grain-paste, porridge and bread. Ancient cereal-based food. » *Laborativ arkeologi* 7: 5-20.
- Haruta, Shin, Shintaro Ueno, Isao Egawa, Kazunori Hashiguchi, Akira Fujii, Masanobu Nagano, Masaharu Ishii, et Yasuo Igarashi. 2006. « Succession of bacterial and fungal communities during a traditional pot fermentation of rice vinegar assessed by PCR-mediated denaturing gradient gel electrophoresis ». *International Journal of Food Microbiology* 109 (1): 79-87.
- Hornsey, Ian Spencer. 2003. *A History of Beer and Brewing*. Royal Society of Chemistry.

- Ho, Thi Nguyet Thu. 2008. « Étude de la flore lactique du nem chua, produit carné fermenté cru traditionnel du sud du Vietnam et maîtrise du processus de fermentation par ajout de souches lactiques sélectionnées spécifiques du produit ». Thèse en Science des aliments et nutrition. Bordeaux: Bordeaux 1.
- Howlett, W. P., G. R. Brubaker, N. Mlingi, et H. Rosling. 1990. « Konzo, an Epidemic Upper Motor Neuron Disease Studied in Tanzania ». *Brain* 113 (1): 223-35. doi:10.1093/brain/113.1.223.
- Imran, M., N. Desmaures, et J.-P. Vernoux. 2010. « From Undefined Red Smear Cheese Consortia to Minimal Model Communities Both Exhibiting Similar Anti-Listerial Activity on a Cheese-like Matrix ». *Food Microbiology* 27 (8): 1095-1103. doi:10.1016/j.fm.2010.07.016.
- Ishigami, Mari, Youji Nakagawa, Masayuki Hayakawa, et Yuzuru Iimura. 2004. « FLO11 Is Essential for Flor Formation Caused by the C-Terminal Deletion of NRG1 in *Saccharomyces Cerevisiae* ». *FEMS Microbiology Letters* 237 (2): 425-30. doi:10.1111/j.1574-6968.2004.tb09726.x.
- Jacob, H. E. 2007. *Six Thousand Years of Bread: Its Holy and Unholy History*. New York: Skyhorse Publishing.
- Jacques, Noémie, et Serge Casaregola. 2008. « Safety assessment of dairy microorganisms: The hemiascomycetous yeasts ». *International Journal of Food Microbiology*, Contribution to the safety assessment of technological microflora found in fermented dairy products, 126 (3): 321-26. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.020.
- Jiang, Huifeng, Wenjun Guan, David Pinney, Wen Wang, et Zhenglong Gu. 2008. « Relaxation of yeast mitochondrial functions after whole-genome duplication ». *Genome Research* 18 (9): 1466-71. doi:10.1101/gr.074674.107.
- Joffe, Alexander H. 1998. « Alcohol and Social Complexity in Ancient Western Asia ». *Current Anthropology* 39 (3): 297-322. doi:10.1086/204736.
- Jung, Mi-Ja, Young-Do Nam, Seong Woon Roh, et Jin-Woo Bae. 2012. « Unexpected Convergence of Fungal and Bacterial Communities during Fermentation of Traditional Korean Alcoholic Beverages Inoculated with Various Natural Starters ». *Food Microbiology* 30 (1): 112-23. doi:10.1016/j.fm.2011.09.008.
- Karp, I. 1980. « Beer drinking and social experience in an African society: An essay in formal sociology ». *Explorations in African systems of thought*, 83-119.
- Kassinen, Anna, Lotta Krogius-Kurikka, Harri Mäkituokko, Teemu Rinttilä, Lars Paulin, Jukka Corander, Erja Malinen, Juha Apajalahti, et Airi Palva. 2007. « The Fecal Microbiota of Irritable Bowel Syndrome Patients Differs Significantly From That of Healthy Subjects ». *Gastroenterology* 133 (1): 24-33. doi:10.1053/j.gastro.2007.04.005.
- Khetarpaul, Neelam, et B.m. Chauhan. 1990. « Effects of Germination and Pure Culture Fermentation by Yeasts and Lactobacilli on Phytic Acid and Polyphenol Content of Pearl Millet ». *Journal of Food Science* 55 (4): 1180-1180. doi:10.1111/j.1365-2621.1990.tb01632.x.
- Kieronczyk, Agnieszka, Siv Skeie, Thor Langsrud, et Mireille Yvon. 2003. « Cooperation between *Lactococcus Lactis* and Nonstarter Lactobacilli in the Formation of Cheese Aroma from Amino Acids ». *Applied and Environmental Microbiology* 69 (2): 734-39. doi:10.1128/AEM.69.2.734-739.2003.



- Kimura, H., R. Nagano, H. Matsusaki, K. SoNoMoTo, et A. Ishizaki. 1997. « A bacteriocin of strain *Pediococcus* sp. ISK-1 isolated from Nukadoko, bed of fermented rice bran ». *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 61 (6): 1049-51.
- Kline, L., et Tf Sugihara. 1971. « Microorganisms of San Francisco Sour Dough Bread Process .2. Isolation and Characterization of Undescribed Bacterial Species Responsible for Souring Activity ». *Applied Microbiology* 21 (3): 459 - &.
- Kunji, Edmund R. S., Igor Mierau, Anja Hagting, Bert Poolman, et Wil N. Konings. 1996. « The Proteolytic Systems of Lactic Acid Bacteria ». *Antonie van Leeuwenhoek* 70 (2-4): 187-221. doi:10.1007/BF00395933.
- Kurtzman, Cletus, J. W. Fell, et Teun Boekhout. 2011. *The Yeasts: A Taxonomic Study*. Elsevier.
- La Barre, Weston. 1938. « Native American Beers ». *American Anthropologist* 40 (2): 224-34. doi:10.1525/aa.1938.40.2.02a00040.
- Lacroix, N., D. St-Gelais, C. P. Champagne, J. Fortin, et J. C. Vuilleumard. 2010. « Characterization of aromatic properties of old-style cheese starters ». *Journal of Dairy Science* 93 (8): 3427-41.
- Laguerre, Sandrine, Myriam Amari, Marlène Vuillemin, Hervé Robert, Valentin Loux, Christophe Klopp, Sandrine Morel, et al. 2012. « Genome Sequences of Three *Leuconostoc Citreum* Strains, LBAE C10, LBAE C11, and LBAE E16, Isolated from Wheat Sourdoughs ». *Journal of Bacteriology* 194 (6): 1610-11. doi:10.1128/JB.06789-11.
- Larousse. Dictionnaire en ligne. Consulté le 12 Août 2014. Disponible en ligne : <http://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/>.
- Lattanzi, Anna, Fabio Minervini, Raffaella Di Cagno, Annamaria Diviccaro, Livio Antonielli, Gianluigi Cardinali, Stefan Cappelle, Maria De Angelis, et Marco Gobbetti. 2013. « The lactic acid bacteria and yeast microbiota of eighteen sourdoughs used for the manufacture of traditional Italian sweet leavened baked goods ». *International Journal of Food Microbiology* 163 (2-3): 71-79. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.010.
- Lederberg, Joshua. 2004. « Of men and microbes ». *New Perspectives Quarterly* 21 (4): 92-96.
- Legras, Jean-Luc, Didier Merdinoglu, Jean-Marie Cornuet, et Francis Karst. 2007. « Bread, Beer and Wine: *Saccharomyces Cerevisiae* Diversity Reflects Human History ». *Molecular Ecology* 16 (10): 2091-2102. doi:10.1111/j.1365-294X.2007.03266.x.
- Legras, J. L, D. Merdinoglu, J. M Cornuet, et F. Karst. 2007. « Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history ». *Molecular ecology* 16 (10): 2091-2102.
- Leite, A.M.O., B. Mayo, C.T.C.C. Rachid, R.S. Peixoto, J.T. Silva, V.M.F. Paschoalin, et S. Delgado. 2012. « Assessment of the Microbial Diversity of Brazilian Kefir Grains by PCR-DGGE and Pyrosequencing Analysis ». *Food Microbiology* 31 (2): 215-21. doi:10.1016/j.fm.2012.03.011.
- Leroy, Frédéric, Anneke Geyzen, Maarten Janssens, Luc De Vuyst, et Peter Scholliers. 2013. « Meat Fermentation at the Crossroads of Innovation and Tradition: A Historical Outlook ». *Trends in Food Science & Technology* 31 (2): 130-37. doi:10.1016/j.tifs.2013.03.008.

- Ley, Ruth E., Peter J. Turnbaugh, Samuel Klein, et Jeffrey I. Gordon. 2006. « Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity ». *Nature* 444 (7122): 1022-23. doi:10.1038/4441022a.
- Libkind, Diego, Chris Todd Hittinger, Elisabete Valério, Carla Gonçalves, Jim Dover, Mark Johnston, Paula Gonçalves, et José Paulo Sampaio. 2011. « Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (35): 14539-44.
- Liem, I. T., K. H. Steinkraus, et T. C. Cronk. 1977. « Production of Vitamin B-12 in Tempeh, a Fermented Soybean Food. » *Applied and Environmental Microbiology* 34 (6): 773-76.
- Li, Xiao-Ran, En-Bo Ma, Liang-Zhen Yan, Han Meng, Xiao-Wei Du, Sheng-Wan Zhang, et Zhe-Xue Quan. 2011. « Bacterial and Fungal Diversity in the Traditional Chinese Liquor Fermentation Process ». *International Journal of Food Microbiology* 146 (1): 31-37. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.030.
- Lopandic, K., S. Zelger, L.K. Bánszky, F. Eliskases-Lechner, et H. Prillinger. 2006. « Identification of Yeasts Associated with Milk Products Using Traditional and Molecular Techniques ». *Food Microbiology* 23 (4): 341-50. doi:10.1016/j.fm.2005.05.001.
- Lopez, Hubert W., Ariane Ouvry, Elisabeth Bervas, Christine Guy, Arnaud Messenger, Christian Demigne, et Christian Remesy. 2000. « Strains of Lactic Acid Bacteria Isolated from Sour Doughs Degrade Phytic Acid and Improve Calcium and Magnesium Solubility from Whole Wheat Flour ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (6): 2281-85. doi:10.1021/jf000061g.
- Lopez, H. Walter, Fanny Leenhardt, Charles Coudray, et Christian Remesy. 2002. « Minerals and Phytic Acid Interactions: Is It a Real Problem for Human Nutrition? ». *International Journal of Food Science & Technology* 37 (7): 727-39. doi:10.1046/j.1365-2621.2002.00618.x.
- Lopez, H. W., V. Krespine, C. Guy, A. Messenger, C. Demigne, et C. Remesy. 2001. « Prolonged Fermentation of Whole Wheat Sourdough Reduces Phytate Level and Increases Soluble Magnesium ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (5): 2657-62. doi:10.1021/jf001255z.
- Luangsakul, Naphatrapi, Suwimon Keeratipibul, Sasitorn Jindamorakot, et Somboon Tanasupawat. 2009. « Lactic Acid Bacteria and Yeasts Isolated from the Starter Doughs for Chinese Steamed Buns in Thailand ». *LWT - Food Science and Technology* 42 (8): 1404-12. doi:10.1016/j.lwt.2009.03.007.
- Mantynen, V. H., M. Korhola, H. Gudmundsson, H. Turakainen, G. A. Alfredsson, H. Salovaara, et K. Lindstrom. 1999. « A Polyphasic Study on the Taxonomic Position of Industrial Sour Dough Yeasts ». *Systematic and Applied Microbiology* 22 (1): 87-96.
- Maoz, Ariel, Ralf Mayr, et Siegfried Scherer. 2003. « Temporal Stability and Biodiversity of Two Complex Antilisterial Cheese-Ripening Microbial Consortia ». *Applied and Environmental Microbiology* 69 (7): 4012-18. doi:10.1128/AEM.69.7.4012-4018.2003.
- Marcellino, Noëlla, et David R. Benson. 1992. « Scanning electron and light microscopic study of microbial succession on Bethlehem St. Nectaire cheese ». *Applied and environmental microbiology* 58 (11): 3448-54.

- Marilley, L. 2004. « Flavours of Cheese Products: Metabolic Pathways, Analytical Tools and Identification of Producing Strains ». *International Journal of Food Microbiology* 90 (2): 139-59. doi:10.1016/S0168-1605(03)00304-0.
- Marín, S, M. E Guynot, P Neira, M Bernadó, V Sanchis, et A. J Ramos. 2002. « Risk assessment of the use of sub-optimal levels of weak-acid preservatives in the control of mould growth on bakery products ». *International Journal of Food Microbiology* 79 (3): 203-11. doi:10.1016/S0168-1605(02)00088-0.
- Marsh, Alan J., Orla O'Sullivan, Colin Hill, R. Paul Ross, et Paul D. Cotter. 2013. « Sequencing-Based Analysis of the Bacterial and Fungal Composition of Kefir Grains and Milks from Multiple Sources ». *PLoS ONE* 8 (7): e69371. doi:10.1371/journal.pone.0069371.
- Martinez-Anaya, M. A., B. Pitarch, P. Bayarri, et C. Benedito De Barber. 1990. « Microflora of the sourdoughs of wheat flour bread. X. Interactions between yeasts and lactic acid bacteria in wheat doughs and their effects on bread quality ». *Cereal chem* 67 (1): 85-91.
- Martin, N., S. Savonitto, P. Molimard, C. Berger, M. Brousse, et H. E. Spinnler. 1999. « Flavor generation in cheese curd by coculturing with selected yeast, mold, and bacteria ». *Journal of Dairy Science* 82 (6): 1072-80.
- Mayr, Ernst. 2001. *What Evolution Is*. Basic Books.
- Mbelesso, P., M.-L. Yogo, E. Yangatimbi, V. de Paul-Sénékian, N.M. Nali, et P.-M. Preux. 2009. « Résurgence de la maladie de konzo dans la région sanitaire no 2 en République centrafricaine ». *Revue Neurologique* 165 (5): 466-70. doi:10.1016/j.neurol.2008.10.020.
- McDonald, Peter, Nancy Henderson, et Shirley Heron. 1991. *The Biochemistry of Silage*. Chalcombe.
- McGarry, A., J. Law, A. Coffey, C. Daly, P. F. Fox, et G. F. Fitzgerald. 1994. « Effect of Genetically Modifying the Lactococcal Proteolytic System on Ripening and Flavor Development in Cheddar Cheese ». *Applied and Environmental Microbiology* 60 (12): 4226-33.
- McGovern, Patrick E. 2009. *Uncorking the Past: The Quest for Wine, Beer, and Other Alcoholic Beverages*. University of California Press.
- McGovern, P. E. 2013. *Ancient Wine: The Search for the Origins of Viniculture*. Princeton University Press.
- McGovern, Patrick E., Donald L. Glusker, Lawrence J. Exner, et Mary M. Voigt. « Neolithic resinated wine ». *Nature*.
- McGovern, Patrick E., Juzhong Zhang, Jigen Tang, Zhiqing Zhang, Gretchen R. Hall, Robert A. Moreau, Alberto Nuñez, et al. 2004. « Fermented beverages of pre-and proto-historic China ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (51): 17593-98.
- McGovern, P. E. 1997. « Wine of Egypt's Golden Age: An Archaeochemical Perspective ». *The Journal of Egyptian Archaeology* 83: 69. doi:10.2307/3822459.

- Mendonça, Regina C.S., Delaine M. Gouvêa, Humberto M. Hungaro, Arthur de F. Sodr , et Amparo Querol-Simon. 2013. « Dynamics of the Yeast Flora in Artisanal Country Style and Industrial Dry Cured Sausage (yeast in Fermented Sausage) ». *Food Control* 29 (1): 143-48. doi:10.1016/j.foodcont.2012.05.057.
- Meroth, C. B., W. P. Hammes, et C. Hertel. 2003. « Identification and Population Dynamics of Yeasts in Sourdough Fermentation Processes by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis ». *Applied and Environmental Microbiology* 69 (12): 7453-61. doi:10.1128/AEM.69.12.7453-7461.2003.
- Messens, Winy, et Luc De Vuyst. 2002. « Inhibitory substances produced by Lactobacilli isolated from sourdoughs—a review ». *International Journal of Food Microbiology* 72 (1–2): 31-43. doi:10.1016/S0168-1605(01)00611-0.
- Metchnikoff, Ilya Ilyich. 1987 (r  dition). *The Prolongation of Life: Optimistic Studies*. Springer Publishing Company.
- Miceli, Marisa H., José A. D  z, et Samuel A. Lee. 2011. « Emerging opportunistic yeast infections ». *The Lancet infectious diseases* 11 (2): 142-51.
- Millet, L., M. Saubusse, R. Didienne, L. Tessier, et M.C. Montel. 2006. « Control of *Listeria Monocytogenes* in Raw-Milk Cheeses ». *International Journal of Food Microbiology* 108 (1): 105-14. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.11.004.
- Minervini, Fabio, Raffaella Di Cagno, Anna Lattanzi, Maria De Angelis, Livio Antonielli, Gianluigi Cardinali, Stefan Cappelle, et Marco Gobbetti. 2012. « Lactic acid bacterium and yeast microbiotas of 19 sourdoughs used for traditional/typical italian breads: interactions between ingredients and microbial species diversity ». *Applied and environmental microbiology* 78 (4): 1251-64. doi:10.1128/AEM.07721-11.
- Minervini, Fabio, Anna Lattanzi, Maria De Angelis, Raffaella Di Cagno, et Marco Gobbetti. 2012. « Influence of artisan bakery- or laboratory-propagated sourdoughs on the diversity of lactic acid bacterium and yeast microbiotas ». *Applied and environmental microbiology* 78 (15): 5328-40. doi:10.1128/AEM.00572-12.
- Moroni, Alice V., Elke K. Arendt, et Fabio Dal Bello. 2011. « Biodiversity of Lactic Acid Bacteria and Yeasts in Spontaneously-Fermented Buckwheat and Teff Sourdoughs ». *Food Microbiology* 28 (3): 497-502. doi:10.1016/j.fm.2010.10.016.
- Mortvedt-Abildgaard, C. I., Jon Nissen-Meyer, Birthe Jelle, Benedikte Grenov, Morten Skaugen, et Ingolf F. Nes. 1995. « Production and pH-Dependent Bactericidal Activity of Lactocin S, a Lantibiotic from *Lactobacillus sake* L45. » *Applied and environmental microbiology* 61 (1): 175-79.
- Mugula, J.K., J.A. Narvhus, et T. S  rhaug. 2003. « Use of Starter Cultures of Lactic Acid Bacteria and Yeasts in the Preparation of Togwa, a Tanzanian Fermented Food ». *International Journal of Food Microbiology* 83 (3): 307-18. doi:10.1016/S0168-1605(02)00386-0.
- Nakajima, Nobuyoshi, Nobuyuki Nozaki, Kohji Ishihara, Akiko Ishikawa, et Hideaki Tsuji. 2005. « Analysis of Isoflavone Content in Tempeh, a Fermented Soybean, and Preparation of a New Isoflavone-Enriched Tempeh ». *Journal of Bioscience and Bioengineering* 100 (6): 685-87. doi:10.1263/jbb.100.685.

- Nakao, Yoshihiro, Takeshi Kanamori, Takehiko Itoh, Yukiko Kodama, Sandra Rainieri, Norihisa Nakamura, Tomoko Shimonaga, Masahira Hattori, et Toshihiko Ashikari. 2009. « Genome Sequence of the Lager Brewing Yeast, an Interspecies Hybrid ». *DNA Research* 16 (2): 115-29. doi:10.1093/dnares/dsp003.
- Nardi, Tiziana, Viviana Corich, Alessio Giacomini, et Bruno Blondin. 2010. « A Sulphite-Inducible Form of the Sulphite Efflux Gene SSU1 in a *Saccharomyces Cerevisiae* Wine Yeast ». *Microbiology* 156 (6): 1686-96. doi:10.1099/mic.0.036723-0.
- Naumova, Elena S., Gennadi I. Naumov, Isabelle Masneuf-Pomarède, Michel Aigle, et Denis Dubourdieu. 2005. « Molecular Genetic Study of Introgression between *Saccharomyces Bayanus* and *S. Cerevisiae* ». *Yeast* 22 (14): 1099-1115. doi:10.1002/yea.1298.
- Naumova, E. S., G. I. Naumov, E. Barrio, et A. Querol. 2010. « Mitochondrial DNA Polymorphism of the Yeast *Saccharomyces Bayanus* Var. *Uvarum* ». *Microbiology* 79 (4): 520-27. doi:10.1134/S0026261710040144.
- Netting, ROBERT McC. 1964. « Beer as a Locus of Value among the West African Kofyar1 ». *American Anthropologist* 66 (2): 375-84. doi:10.1525/aa.1964.66.2.02a00120.
- Nuobariene, Lina, Åse S. Hansen, et Nils Arneborg. 2012. « Isolation and Identification of Phytase-Active Yeasts from Sourdoughs ». *LWT - Food Science and Technology* 48 (2): 190-96. doi:10.1016/j.lwt.2012.03.011.
- Onno B., Valcheva Rossi, Dousset X. 2009. Les levains de panification : un écosystème microbien céréalier complexe et des fonctionnalités spécifiques. In *Bactéries lactiques* Coord. D.Drider & H.Prévost. Ed. Economica
- Palomba, Simona, Giuseppe Blaiotta, Valeria Ventorino, Alessandro Saccone, et Olimpia Pepe. 2011. « Microbial Characterization of Sourdough for Sweet Baked Products in the Campania Region (southern Italy) by a Polyphasic Approach ». *Annals of Microbiology* 61 (2): 307-14. doi:10.1007/s13213-010-0140-2.
- Pasha, Chand, et Gopal Reddy. 2005. « Nutritional and Medicinal Improvement of Black Tea by Yeast Fermentation ». *Food Chemistry* 89 (3): 449-53. doi:10.1016/j.foodchem.2004.02.054.
- Pattison, T-L., D. Lindsay, et A. Von Holy. 2004. « Natural antimicrobials as potential replacements for calcium propionate in bread ». *South African Journal of Science* 100 (7 & 8): 342-48.
- Pearson, A. M., et T. A. Gillett. 1996. *Processed Meats*. Springer.
- Pedersen, Line Lindegaard, James Owusu-Kwarteng, Line Thorsen, et Lene Jespersen. 2012. « Biodiversity and Probiotic Potential of Yeasts Isolated from Fura, a West African Spontaneously Fermented Cereal ». *International Journal of Food Microbiology* 159 (2): 144-51. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.016.
- Penders, J., E. E. Stobberingh, P. A. van den Brandt, et C. Thijs. 2007. « The Role of the Intestinal Microbiota in the Development of Atopic Disorders ». *Allergy* 62 (11): 1223-36. doi:10.1111/j.1398-9995.2007.01462.x.

- Pierre, Olivier, et Pierre Veit. 1996. « Plan de surveillance de la contamination par *Listeria monocytogenes* des aliments distribués. Résultats des plans 1993-1994. Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF) ». Bulletin épidémiologique hebdomadaire.
- Piton, Christine. 1988. « Evolution de la flore microbienne de surface du gruyère de Comté au cours de l'affinage ». *Le Lait* 68 (4): 419-33.
- Poutanen, Kaisa, Laura Flander, et Kati Katina. 2009. « Sourdough and Cereal Fermentation in a Nutritional Perspective ». *Food Microbiology* 26 (7): 693-99. doi:10.1016/j.fm.2009.07.011.
- Prajapati, Jashbhai B., et Baboo M. Nair. 2003. « The history of fermented foods ». In *Fermented Functional Foods*, CRC Press, 1-25. Boca Raton(, New York, London, Whashington DC): Edward R. (Ted) Farnworth.
- Pretorius, Isak S. 2000. « Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking ». *Yeast* 16 (8): 675-729.
- Pulvirenti, Andrea, Cinzia Caggia, Cristina Restuccia, Maria Gullo, et Paolo Giudici. 2001. « DNA fingerprinting methods used for identification of yeasts isolated from Sicilian sourdoughs ». *Annals of microbiology* 51 (1): 107-20.
- Rackham, H. 1967. *Pliny Natural History with an English translation in ten volumes*. Loeb Library edition. Vol. 5. Harvard University, Boston.
- Reale, A., T. Di Renzo, M. Succi, P. Tremonte, R. Coppola, et E. Sorrentino. 2013. « Microbiological and Fermentative Properties of Baker's Yeast Starter Used in Breadmaking: Baker's Yeast Quality... ». *Journal of Food Science* 78 (8): M1224-31. doi:10.1111/1750-3841.12206.
- Reale, Anna, Luisa Mannina, Patrizio Tremonte, Anatoli P. Sobolev, Mariantonietta Succi, Elena Sorrentino, et Raffaele Coppola. 2004. « Phytate Degradation by Lactic Acid Bacteria and Yeasts during the Wholemeal Dough Fermentation: a <sup>31</sup>P NMR Study ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (20): 6300-6305. doi:10.1021/jf049551p.
- Reid, Gregor, Jana Jass, M. Tom Sebulsky, et John K. McCormick. 2003. « Potential Uses of Probiotics in Clinical Practice ». *Clinical Microbiology Reviews* 16 (4): 658-72. doi:10.1128/CMR.16.4.658-672.2003.
- Reps, A. 1993. « Bacterial Surface-Ripened Cheeses ». In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, édité par P. F. Fox, 137-72. Springer US. [http://link.springer.com.gate1.inist.fr/chapter/10.1007/978-1-4615-2648-3\\_5](http://link.springer.com.gate1.inist.fr/chapter/10.1007/978-1-4615-2648-3_5).
- Retureau, Émilie, Cécile Callon, Robert Didiéne, et Marie-Christine Montel. 2010. « Is microbial diversity an asset for inhibiting *Listeria monocytogenes* in raw milk cheeses? ». *Dairy Science & Technology* 90 (4): 375-98. doi:10.1051/dst/2010010.
- Rhind, Nicholas, Zehua Chen, Moran Yassour, Dawn A. Thompson, Brian J. Haas, Naomi Habib, Ilan Wapinski, et al. 2011. « Comparative Functional Genomics of the Fission Yeasts ». *Science* 332 (6032): 930-36. doi:10.1126/science.1203357.

- Rizzello, C. G, L. Nionelli, R. Coda, M. De Angelis, et M. Gobbetti. 2009. « Effect of sourdough fermentation on stabilisation, and chemical and nutritional characteristics of wheat germ ». *Food Chemistry*.
- Robert, Hervé, Valérie Gabriel, et Catherine Fontagné-Faucher. 2009. « Biodiversity of lactic acid bacteria in French wheat sourdough as determined by molecular characterization using species-specific PCR ». *International Journal of Food Microbiology* 135 (1): 53-59. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.006.
- Rocha, João M., et F. Xavier Malcata. 2012. « Microbiological Profile of Maize and Rye Flours, and Sourdough Used for the Manufacture of Traditional Portuguese Bread ». *Food Microbiology* 31 (1): 72-88. doi:10.1016/j.fm.2012.01.008.
- Rosenquist, H., et Å. Hansen. 1998. « The Antimicrobial Effect of Organic Acids, Sour Dough and Nisin against *Bacillus Subtilis* and *B. Licheniformis* Isolated from Wheat Bread ». *Journal of Applied Microbiology* 85 (3): 621-31. doi:10.1046/j.1365-2672.1998.853540.x.
- Rosenquist, H., et A. Hansen. 2000. « The Microbial Stability of Two Bakery Sourdoughs Made from Conventionally and Organically Grown Rye ». *Food Microbiology* 17 (3): 241-50. doi:10.1006/fmic.1999.0313.
- Roth, Emmanuelle, Susanne Miescher Schwenninger, Madlen Hasler, Elisabeth Eugster-Meier, et Christophe Lacroix. 2010. « Population Dynamics of Two Antilisterial Cheese Surface Consortia Revealed by Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis ». *BMC Microbiology* 10 (1): 74. doi:10.1186/1471-2180-10-74.
- Roussel, Philippe, et Hubert Chiron. 2005. *Les pains français : évolution, qualité, production (2° Ed.)*. Lavoisier.
- Rozpędowska, Elżbieta, Linda Hellborg, Olena P. Ishchuk, Furkan Orhan, Silvia Galafassi, Annamaria Merico, Megan Woolfit, Concetta Compagno, et Jure Piškur. 2011. « Parallel Evolution of the Make–accumulate–consume Strategy in *Saccharomyces* and *Dekkera* Yeasts ». *Nature Communications* 2 (mai): 302. doi:10.1038/ncomms1305.
- Sabir, Dliir Amin, Pari Hama Sharef, et others. 2013. « Effect of using sourdough on the rheological properties, sensory and shelf life stability of loaf bread. » *Journal of Agricultural Science and Technology, B* 3 (4): 306-12.
- Sahl, Hans-Georg, Ralph W. Jack, et Gabriele Bierbaum. 1995. « Biosynthesis and Biological Activities of Lantibiotics with Unique Post-Translational Modifications ». *European Journal of Biochemistry* 230 (3): 827-53. doi:10.1111/j.1432-1033.1995.0827g.x.
- Sakharkar, K. R., et M. K. Sakharkar. 2009. « Yeast Genomics for Bread, Beer, Biology, Bucks and Breath. » In *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*, pp. 473-85. Springer Netherlands.  
[http://scholar.google.fr/scholar?q=sakharkar+sakharkar+2009+yeast+bread&btnG=&hl=fr&as\\_sdt=0%2C5](http://scholar.google.fr/scholar?q=sakharkar+sakharkar+2009+yeast+bread&btnG=&hl=fr&as_sdt=0%2C5).
- Salque, Mélanie, Peter I. Bogucki, Joanna Pyzel, Iwona Sobkowiak-Tabaka, Ryszard Grygiel, Marzena Szymt, et Richard P. Evershed. 2013. « Earliest Evidence for Cheese Making in the Sixth Millennium Bc in Northern Europe ». *Nature* 493 (7433): 522-25. doi:10.1038/nature11698.

- Samuel, Delwen. 2002. « Bread in archaeology ». *Civilisations*, n° 49 (juin): 27-36. doi:10.4000/civilisations.1353.
- Sandberg, A.-S., et U. Svanberg. 1991. « Phytate Hydrolysis by Phytase in Cereals; Effects on In Vitro Estimation of Iron Availability ». *Journal of Food Science* 56 (5): 1330-33. doi:10.1111/j.1365-2621.1991.tb04765.x.
- Saubusse, M., L. Millet, C. Delbès, C. Callon, et M.C. Montel. 2007. « Application of Single Strand Conformation Polymorphism — PCR Method for Distinguishing Cheese Bacterial Communities That Inhibit *Listeria Monocytogenes* ». *International Journal of Food Microbiology* 116 (1): 126-35. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.12.024.
- Scheirlinck, Ilse, Roel Van der Meulen, Ann Van Schoor, Marc Vancanneyt, Luc De Vuyst, Peter Vandamme, et Geert Huys. 2007. « Influence of Geographical Origin and Flour Type on Diversity of Lactic Acid Bacteria in Traditional Belgian Sourdoughs ». *Applied and Environmental Microbiology* 73 (19): 6262-69. doi:10.1128/aem.00894-07.
- Schieberle, Peter, et Werner Grosch. 1991. « Potent Odorants of the Wheat Bread Crumb Differences to the Crust and Effect of a Longer Dough Fermentation ». *Zeitschrift Für Lebensmittel-Untersuchung Und Forschung* 192 (2): 130-35. doi:10.1007/BF01202626.
- Schillinger, U., et F. K. Lücke. 1989. « Antibacterial Activity of *Lactobacillus* Sake Isolated from Meat. » *Applied and Environmental Microbiology* 55 (8): 1901-6.
- Schmidt, J. L., J. Lenoir, Michèle SCHMIDT, L. U. U. Than, et Christine GRAFFARD. 1978. « Contribution à l'étude de la flore levure du fromage de Camembert. Son évolution au cours de la maturation ». *Le lait* 58 (577): 355-70.
- Seifert, J., et G. Mogensen. 2002. « Inventory of Microorganisms with a documented history of use in food ». *Bulletin of the IDF*, n° 377.
- Selhub, E. M, A. C Logan, et A. C Bsted. 2014. « Fermented foods, microbiota, and mental health: ancient practice meets nutritional psychiatry ». *J Physiol Anthropol* 33 (1): 2.
- Shatta, A. A., A. M. El-Kholy, et M. M. Osman. 2004. « Effect of Lactic Acid Starters and Probiotic Bacteria on Some Antinutritional Compounds Associated with Foods ». *Mansoura University Journal of Agricultural Sciences (Egypt)*, octobre. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=EG2005000951>.
- Sicard, Delphine, et Jean-Luc Legras. 2011. « Bread, Beer and Wine: Yeast Domestication in the *Saccharomyces Sensu Stricto* Complex ». *Comptes Rendus Biologies* 334 (3): 229-36. doi:10.1016/j.crvi.2010.12.016.
- Simonson, Lauri, Hannu Salovaara, et Matti Korhola. 2003. « Response of wheat sourdough parameters to temperature, NaCl and sucrose variations ». *Food Microbiology* 20 (2): 193-99. doi:10.1016/S0740-0020(02)00117-X.
- Sims, Charles A., Janet S. Eastridge, et Robert P. Bates. 1995. « Changes in Phenols, Color, and Sensory Characteristics of Muscadine Wines by Pre- and Post-Fermentation Additions of PVPP, Casein, and Gelatin ». *American Journal of Enology and Viticulture* 46 (2): 155-58.



- Smacchi, Emanuele, Patrick F. Fox, et Marco Gobetti. 1999. « Purification and characterization of two extracellular proteinases from *Arthrobacter nicotianae* 9458 ». *FEMS microbiology letters* 170 (2): 327-33.
- Smit, G, B Smit, et W Engels. 2005. « Flavour Formation by Lactic Acid Bacteria and Biochemical Flavour Profiling of Cheese Products ». *FEMS Microbiology Reviews* 29 (3): 591-610. doi:10.1016/j.femsre.2005.04.002.
- Sokol, Harry, Philippe Seksik, Lionel Rigottier-Gois, Christophe Lay, Patricia Lepage, Isabelle Podglajen, Philippe Marteau, et Joël Doré. 2006. « Specificities of the Fecal Microbiota in Inflammatory Bowel Disease ». *Inflammatory Bowel Diseases* 12 (2): 106-11. doi:10.1097/01.MIB.0000200323.38139.c6.
- Spor, Ayme, Thibault Nidelet, Jonattan Simon, Aurelie Bourgaïs, Dominique de Vienne, et Delphine Sicard. 2009. « Niche-Driven Evolution of Metabolic and Life-History Strategies in Natural and Domesticated Populations of *Saccharomyces Cerevisiae* ». *Bmc Evolutionary Biology* 9 (décembre). doi:10.1186/1471-2148-9-296.
- Spor, Ayme, Shaoxiao Wang, Christine Dillmann, Dominique de Vienne, et Delphine Sicard. 2008. « “Ant” and “Grasshopper” Life-History Strategies in *Saccharomyces Cerevisiae* ». *Plos One* 3 (2). doi:10.1371/journal.pone.0001579.
- Steinkraus, K. H., Y. B. Hwa, J. P. Buren, M. I. Provvidenti, et D. B. Hand. 1960. « Studies on Tempeh - An Indonesian soybean food ». *Journal of Food Science* 25 (6): 777-88.
- Succi, M, A Reale, C Andrighetto, A Lombardi, E Sorrentino, et R Coppola. 2003. « Presence of Yeasts in Southern Italian Sourdoughs from *Triticum Aestivum* Flour ». *FEMS Microbiology Letters* 225 (1): 143-48. doi:10.1016/S0378-1097(03)00500-7.
- Sugihara, Tf, L. Kline, et Mw Miller. 1971. « Microorganisms of San Francisco Sour Dough Bread Process .1. Yeasts Responsible for Leavening Action ». *Applied Microbiology* 21 (3): 456 - &.
- Thomas, Frédéric, Thierry Lefevre, et Michel Raymond. 2010. *Biologie évolutive*. Édition : Première édition. Bruxelles: DE BOECK UNIVERSITE.
- Thomson, J. Michael, Eric A. Gaucher, Michelle F. Burgan, Danny W. De Kee, Tang Li, John P. Aris, et Steven A. Benner. 2005. « Resurrecting Ancestral Alcohol Dehydrogenases from Yeast ». *Nature Genetics* 37 (6): 630-35. doi:10.1038/ng1553.
- Turnbaugh, Peter J., Fredrik Bäckhed, Lucinda Fulton, et Jeffrey I. Gordon. 2008. « Diet-Induced Obesity Is Linked to Marked but Reversible Alterations in the Mouse Distal Gut Microbiome ». *Cell Host & Microbe* 3 (4): 213-23. doi:10.1016/j.chom.2008.02.015.
- UNCED (United Nations Conference on Environment and Development), 2000. Convention on biological diversity. In Proceedings of the United Nation conference on environment and development, Rio de Janeiro, Brazil. Consulté le 13 Septembre 2014. Disponible en ligne : [http://www.google.fr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&ved=0CCwQFjAB&url=http%3A%2F%2Functad.org%2Fen%2Fdocs%2Ftd364rev1\\_en.pdf&ei=gLp9VP\\_8E4vbar2TgNAH&usg=AFQjCNFNcY3xVjmQalzp4BTWIMYcAICpxA&bvm=bv.80642063,d.d2s](http://www.google.fr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&ved=0CCwQFjAB&url=http%3A%2F%2Functad.org%2Fen%2Fdocs%2Ftd364rev1_en.pdf&ei=gLp9VP_8E4vbar2TgNAH&usg=AFQjCNFNcY3xVjmQalzp4BTWIMYcAICpxA&bvm=bv.80642063,d.d2s)

- Valamoti, S., M. Mangafa, C. Koukouli-Chrysanthaki, et D. Malamidou. 2007. « Grape-Pressings from Northern Greece: The Earliest Wine in the Aegean? ».
- Valcheva, R., M. F. Ferchichi, M. Korakli, I. Ivanova, M. G. Ganzle, R. F. Vogel, H. Prevost, B. Onno, et X. Dousset. 2006. « *Lactobacillus Nantensis* Sp Nov., Isolated from French Wheat Sourdough ». *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56 (mars): 587-91. doi:10.1099/ijls.0.63619-0.
- Valcheva, R., M. Korakli, B. Onno, H. Prevost, I. Ivanova, M. A. Ehrmann, X. Dousset, M. G. Ganzle, et R. F. Vogel. 2005. « *Lactobacillus Hammesii* Sp Nov., Isolated from French Sourdough ». *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55 (mars): 763-67. doi:10.1099/ijls.0.63311-0.
- Valmorri, Sara, Rosanna Tofalo, Luca Settanni, Aldo Corsetti, et Giovanna Suzzi. 2010. « Yeast Microbiota Associated with Spontaneous Sourdough Fermentations in the Production of Traditional Wheat Sourdough Breads of the Abruzzo Region (Italy) ». *Antonie van Leeuwenhoek* 97 (2): 119-29. doi:10.1007/s10482-009-9392-x.
- Valmorri, S., L. Settanni, G. Suzzi, F. Gardini, P. Vernocchi, et A. Corsetti. 2006. « Application of a Novel Polyphasic Approach to Study the Lactobacilli Composition of Sourdoughs from the Abruzzo Region (central Italy) ». *Letters in Applied Microbiology* 43 (3): 343-49. doi:10.1111/j.1472-765X.2006.01942.x.
- Van Boekel, Martinus, Vincenzo Fogliano, Nicoletta Pellegrini, Catherine Stanton, Gabriele Scholz, Sam Lalljie, Veronika Somoza, Dietrich Knorr, Pratima Rao Jasti, et Gerhard Eisenbrand. 2010. « A review on the beneficial aspects of food processing ». *Molecular Nutrition & Food Research* 54 (9): 1215-47.
- Venema, Koen, Gerard Venema, et Jan Kok. 1995. « Lactococcal bacteriocins: mode of action and immunity ». *Trends in Microbiology* 3 (8): 299-304. doi:10.1016/S0966-842X(00)88958-1.
- Venturi, Manuel, Simona Guerrini, et Massimo Vincenzini. 2012. « Stable and Non-Competitive Association of *Saccharomyces Cerevisiae*, *Candida Milleri* and *Lactobacillus Sanfranciscensis* during Manufacture of Two Traditional Sourdough Baked Goods ». *Food Microbiology* 31 (1): 107-15. doi:10.1016/j.fm.2012.02.011.
- Vera, Annabelle, Mai Huong Ly-Chatain, Véronique Rigobello, et Yann Demarigny. 2012. « Description of a French Natural Wheat Sourdough over 10 Consecutive Days Focussing on the Lactobacilli Present in the Microbiota ». *Antonie van Leeuwenhoek* 101 (2): 369-77. doi:10.1007/s10482-011-9642-6.
- Vernocchi, Pamela, Sara Valmorri, Veronica Gatto, Sandra Torriani, Andrea Gianotti, Giovanna Suzzi, Maria Elisabetta Guerzoni, et Fausto Gardini. 2004. « A Survey on Yeast Microbiota Associated with an Italian Traditional Sweet-Leavened Baked Good Fermentation ». *Food Research International* 37 (5): 469-76. doi:10.1016/j.foodres.2004.01.004.
- Vogelmann, Stephanie A., et Christian Hertel. 2011. « Impact of Ecological Factors on the Stability of Microbial Associations in Sourdough Fermentation ». *Food Microbiology* 28 (3): 583-89. doi:10.1016/j.fm.2010.11.010.
- Vogelmann, Stephanie A., Michael Seitter, Ulrike Singer, Markus J. Brandt, et Christian Hertel. 2009. « Adaptability of Lactic Acid Bacteria and Yeasts to Sourdoughs Prepared from Cereals,

- Pseudocereals and Cassava and Use of Competitive Strains as Starters ». *International Journal of Food Microbiology* 130 (3): 205-12. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.01.020.
- Vogel, R. F., M. A. Ehrmann, et M. G. Ganzle. 2002. « Development and Potential of Starter Lactobacilli Resulting from Exploration of the Sourdough Ecosystem ». *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 81 (1-4): 631-38. doi:10.1023/A:1020530227192.
- Vrancken, Gino, Luc De Vuyst, Roel Van der Meulen, Geert Huys, Peter Vandamme, et Heide-Marie Daniel. 2010. « Yeast Species Composition Differs between Artisan Bakery and Spontaneous Laboratory Sourdoughs ». *Fems Yeast Research* 10 (4): 471-81. doi:10.1111/j.1567-1364.2010.00621.x.
- Vrancken, Gino, Tom Rimaux, Stefan Weckx, Frederic Leroy, et Luc De Vuyst. 2011. « Influence of Temperature and Backslopping Time on the Microbiota of a Type I Propagated Laboratory Wheat Sourdough Fermentation ». *Applied and Environmental Microbiology* 77 (8): 2716-26. doi:10.1128/AEM.02470-10.
- Wood, Ed. 1989. *World Sourdoughs from Antiquity*. Cascade, ID: Sinclair Pub.
- Yang, Yimin, Anna Shevchenko, Andrea Knaust, Idelisi Abuduresule, Wenying Li, Xingjun Hu, Changsui Wang, et Andrej Shevchenko. 2014. « Proteomics Evidence for Kefir Dairy in Early Bronze Age China ». *Journal of Archaeological Science* 45 (mai): 178-86. doi:10.1016/j.jas.2014.02.005.
- Yongfa, Wang, Yan Yongshan, Xu Jiujin, Du Ruofu, S. D. Flatz, W. Kühnau, et G. Flatz. 1984. « Prevalence of primary adult lactose malabsorption in three populations of northern China ». *Human genetics* 67 (1): 103-6.
- Yousif, M. R. G., et M. Safaa. 2014. « Effect of Using Different Types of Yeasts on the Quality of Egyptian Balady Bread ». *Journal of American Science* 10 (2). [http://www.jofamericanscience.org/journals/am-sci/am1002/016\\_23165am100214\\_100\\_109.pdf](http://www.jofamericanscience.org/journals/am-sci/am1002/016_23165am100214_100_109.pdf).
- Yuasa, Noriyuki, Youji Nakagawa, Masayuki Hayakawa, et Yuzuru Iimura. 2004. « Distribution of the sulfite resistance gene SSU1-R and the variation in its promoter region in wine yeasts ». *Journal of Bioscience and Bioengineering* 98 (5): 394-97. doi:10.1016/S1389-1723(04)00303-2.
- Zeuthen, Peter. 2007. *Handbook of fermented meat and poultry. Handbook of Fermented Meat and Poultry*. <http://books.google.fr/books?hl=fr&lr=&id=ie2lxsLTqfgC&oi=fnd&pg=PA3&dq=zeuthen+2007+fermentation&ots=3IGlrfTNPM&sig=2zDqRmKmMvQpKN8StCF3V14Zlql#v=onepage&q&f=false>.
- Zhang, Jiachao, Wenjun Liu, Zhihong Sun, Qiuhua Bao, Fang Wang, Jie Yu, Wei Chen, et Heping Zhang. 2011. « Diversity of lactic acid bacteria and yeasts in traditional sourdoughs collected from western region in Inner Mongolia of China ». *Food Control* 22 (5): 767-74. doi:10.1016/j.foodcont.2010.11.012.
- Zhang, Xue, Baohua Kong, et Youling L. Xiong. 2007. « Production of cured meat color in nitrite-free Harbin red sausage by *Lactobacillus fermentum* fermentation ». *Meat Science* 77 (4): 593-98. doi:10.1016/j.meatsci.2007.05.010.

# **Chapitre 1 :**

## **MATERIEL et METHODES**

1. Collecte de levains et pâtes à pain .....	63
2. Analyses culturelles .....	66
2.1. Isolement des levures.....	66
2.2. Stockage des souches.....	67
2.3. Méthode d'identification culturelle .....	67
2.3.1. Extraction d'ADN .....	67
2.3.2. PCR/RFLP de la région NTS .....	68
2.3.3. Séquençage de la région <i>D1/D2</i> de la sous unité 26S et du gène de l'Actine.....	69
3. Analyses de diversité.....	71
4. Analyses non culturelles.....	72
4.1. Préparation d'un levain synthétique.....	72
4.2. Choix de l'amplicon .....	73
4.3. Extraction d'ADN total des levains .....	77
4.4. Amplification PCR de la région ITS1 .....	77
4.4.1. Amplification de la région ITS1.....	77
4.4.2. Ajout des amorces taguées .....	78
4.4.3. Purification des amplifications et pyroséquençage .....	80
4.5. Séquençage de souches isolées de boulangerie .....	81
4.6. Analyses bioinformatiques des données de pyroséquençage .....	81
4.6.1. Observation de la qualité des séquences.....	81
4.6.2. Démultiplexage et filtrage des séquences du pyroséquençage.....	81
4.6.3. Assignation des séquences.....	83
4.6.4. Analyses de la diversité .....	85
5. Données de phénotypage .....	86
5.1. Fermentation des sucres .....	87
5.2. Milieu minimum .....	88
5.3. Milieu glycérol .....	88
5.4. Milieu de sporulation .....	88
5.5. Taille du génome .....	89
5.6. Taille des cellules.....	90
6. Analyses statistiques .....	90
6.1. Analyses descriptives de la densité des levures et LAB et des propriétés chimiques du levain	90
6.2. Analyses des densités de levures et de LAB pour cinq fournils .....	90

6.3. Analyses des pratiques de panification .....	91
6.4. Analyses des densités de levures pour 14 fours .....	92
BIBLIOGRAPHIE.....	94

## 1. Collecte de levains et pâtes à pain

Des échantillons de levains de 14 fournils ont été prélevés dans des pots propres ou stériles (environ 30 à 200g) puis transportés et conservés à 4 °C. Les fournils ont été choisis selon leur répartition géographique et la pratique de panification qui leur était associée (Tableau 1, Figure 1). Dans tous ces fournils, de la farine issue de l'Agriculture Biologique est utilisée. Les méthodes de panification, collectées grâce à un questionnaire semi-dirigé (Annexe 1) puis à une interface en ligne finalisée par Emilie Lhomme ([https://docs.google.com/forms/d/1fatq-qKiK58fPPRDeQde0FgYO\\_axVDmjZCWccnQjDgo/viewform?edit\\_requested=true](https://docs.google.com/forms/d/1fatq-qKiK58fPPRDeQde0FgYO_axVDmjZCWccnQjDgo/viewform?edit_requested=true)), sont présentées dans le Tableau 1.

Entre 2012 et 2013, deux campagnes d'échantillonnage ont été menées sur cinq et 14 fournils, respectivement (Tableau 1). Au total, 90 échantillons de pâte ou levain ont été prélevés :

- 12 dans les fournils 1, 2 et 3 ;
- 16 dans les fournils 4 et 5 ;
- 2 dans les fournils 6 à 8 et 11 à 14 ;
- 4 dans les fournils 9 et 10.

Deux levains ont été analysés dans le fournil 10 : un levain liquide et un levain pâteux.

L'échantillonnage a eu lieu (Tableau 1):

- Dans les fournils 1 à 5, à 4 moments clefs du processus de panification lors de la première campagne d'échantillonnage ("levain chef", "levain tout point", "pâte à pain après pétrissée", "pâte à pain avant cuisson", Figure 2). À chaque étape du processus de panification, deux répliquats de pâte ont été prélevés, sans spécification de la zone de levain prélevé.
- Dans les fournils 1 à 14, dans le "levain tout point" lors de la seconde campagne d'échantillonnage. Dans les fournils 6 à 14, seul le "levain tout point" a été prélevé. Deux prélèvements ont été effectués : un au bord, l'autre au cœur de la pâte (répliquat de pâte) sauf pour le fournil 1 où deux prélèvements au cœur de la pâte ont été effectués.

Les levains ont été divisés en trois en arrivant au laboratoire après chaque échantillonnage : une partie a servi à l'analyse de la diversité par méthode culturale, les deux autres ont été congelées à -20°C à ONIRIS (Nantes) et à l'UMR de Génétique Végétale du Moulon (Gif-sur-Yvette). Les échantillons congelés provenant du cœur du levain du second échantillonnage ont servi à l'analyse non culturale, par pyroséquençage d'amplicons.

**Tableau 1** : Caractéristiques des levains échantillonnés et description des pratiques de panification associées.

Boulangier			étude dynamique			mise au point analyse non culturale			levain chef			ingrédients et technologie associée à la panification									
identifiant	localisation	statut	Prélèvement a	date prélèvement a	Réplicat pâte a	Prélèvement b	date prélèvement b	Réplicat pâte b	conservation	âge (années)	origine	nb rafr.	% levain	pétrissage	nb panif/sem	origine eau	farine	variétés blé	moulin	levure comm.	
1	SO	paysan_boulangier	LC/TP/AP/AC	févr-12	coeur	TP	nov-12	coeur/coeur	TA	<1	pâte	2	43	mécanique	2	robinet	site	mix	meule	non	
2	SO	paysan_boulangier	LC/TP/AP/AC	mars-12	coeur	TP	déc-12	2	froid	12	pâte	3	16	mécanique	2	robinet	site	anciennes	meule	non	
3	SE	paysan_boulangier	LC/TP/AP/AC	mars-12	coeur	TP	janv-13	2	froid	10	levain	2	15	manuel	3	robinet	site	anciennes	meule	non	
4	NO	boulangier	LC/TP/AP/AC	avr-12	coeur	TP	janv-13	2	froid	20	pâte	1	33	mécanique	4	robinet	meunier	mix	NA	non	
5	NO	boulangier	LC/TP/AP/AC	mai-12	coeur	TP	déc-12	2	froid	20	levain	1	10	mécanique	6	robinet	meunier	NA	meule	oui	
6	NE	boulangier				TP	avr-13	coeur/bord	froid	1	pâte + levain	1	17	mécanique	6	robinet	meunier	modernes	meule	non	
7	NO	boulangier				TP	avr-13	coeur/bord	froid	29	pâte	1	9	mécanique	4	traîtée	meunier	NA	NA	non	
8	NO	boulangier				TP	avr-13	coeur/bord	TA	33	levain	1	24	mécanique	7	traîtée	meunier	NA	meule	oui	
9	NO	boulangier				TP/TP	avr-13	coeur/bord	TA	2	pâte + levain	1	18	mécanique	5	robinet	site	modernes	NA	oui	
10	SE	boulangier				TP_ferme/TP_liquide	avr-13	coeur/bord	froid	13	levain	2	20	mécanique	6	robinet	meunier	NA	cylindre	non	
11	NE	boulangier				TP	avr-13	coeur/bord	froid	NA	levain	4	4	mécanique	7	robinet	meunier	NA	meule	oui	
12	NO	paysan_boulangier				TP	avr-13	coeur/bord	TA	NA	pâte	2	14	manuel	2	traîtée	site	anciennes	meule	non	
13	NE	boulangier				TP	avr-13	coeur/bord	froid	<1	pâte	3	11	manuel	1	robinet	meunier	anciennes	meule	non	
14	NE	boulangier				TP	avr-13	coeur/bord	TA & froid	>15	pâte	2	2	mécanique	4	traîtée	meunier	modernes	meule	non	

\*Point de prélèvement : LC = « levain chef », TP = « levain tout point », TP\_ferme = « levain tout point » ferme, TP\_liquide = « levain tout point » liquide, AP = « pâte à pain après pétrissage », AC = « pâte à pain avant cuisson ».

\*Réplicat pâte : cœur = prélèvement au centre du levain ou de la pâte, bord = prélèvement en surface du levain ou de la pâte, 2 = deux prélèvements effectués dans la même pâte, au même moment, sans précision du morceau de pâte échantillonné.

\*Levain chef - Conservation : TA = température ambiante, froid = conservation au frigo ou dans un espace où la température est inférieure à 7 °C.

\*Levain chef - Origine (provenance du chef par rapport à la fournée précédente) : pâte = récupération de pâte à pain de la fournée précédente, levain = récupération d'un peu de levain de la fournée précédente.

\*Nb rafr. : nombre de rafraichis entre deux processus de panification

\*% levain : pourcentage de levain par rapport à la pâte à pain.

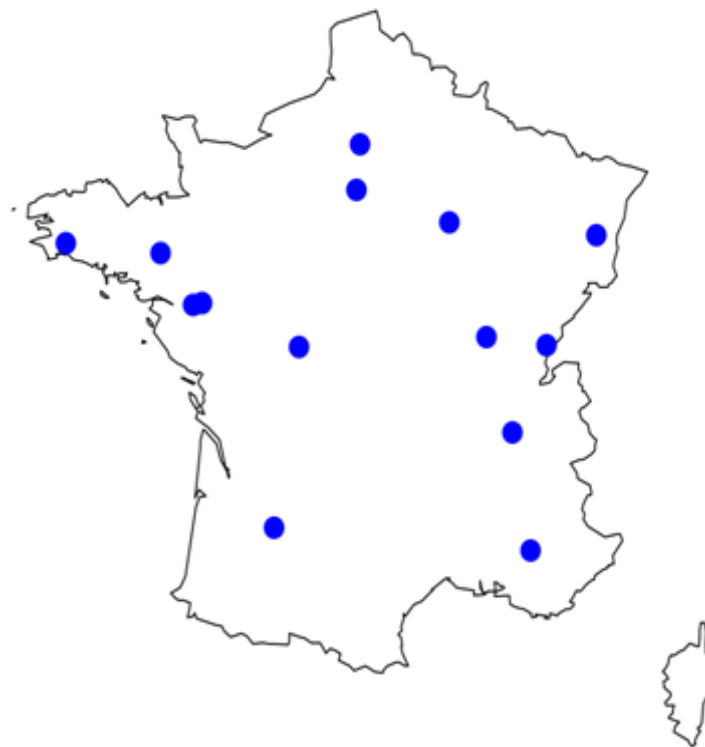
\*Nb panif/sem : nombre de panifications par semaine. Origine eau (provenance de l'eau lors des rafraichis et de la panification)

\*Origine de l'eau: robinet = eau non traitée, traitée = eau de source ou filtrée préalablement.

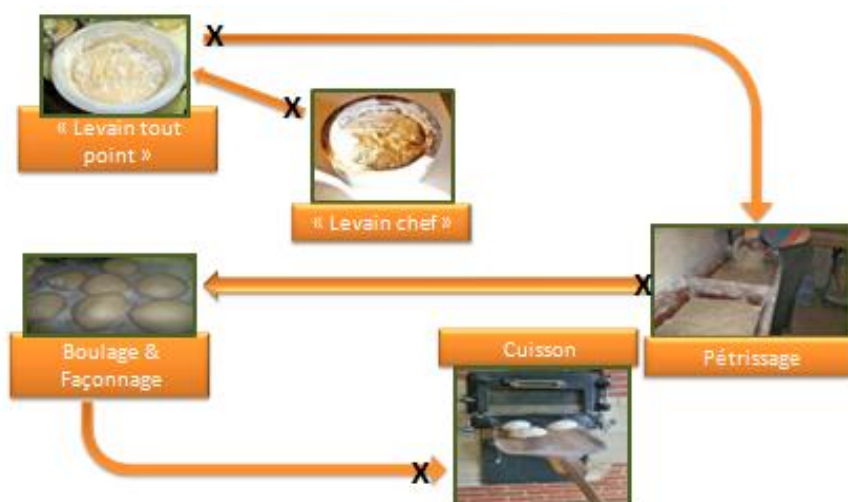
\*Farine (lieu où se fait la mouture du blé) : site = production de farine sur le site par le boulangier, meunier = production de farine par un meunier, autre que le boulangier.

\*Levure comm. : non = pas d'utilisation de levure commerciale dans la boulangerie, oui = utilisation de levure commerciale pour certains produits de panification dans l'enceinte de la boulangerie.





**Figure 1 :** Répartition des 14 fournils sur le territoire français



**Figure 2 :** Processus de panification et prélèvement. Chaque croix représente un point de prélèvement ("levain chef", "levain tout point", "pâte à pain après pétrissée" et "pâte à pain avant cuisson").

## Analyses culturelles

### 1.1. Isolement des levures

Les isollements ont été réalisés après des étalements directs, en triplicat : 10 grammes de levain ont été dilués dans un volume de 90 mL de solution de Triptone-sel (TS : 0.85 % (wt/vol) NaCl; 0.1 % tryptone (wt/vol)). La solution a été homogénéisée manuellement ou à l'aide d'un Stomacher (AES Laboratories, France) pendant 2 minutes. Des dilutions en série ont été réalisées afin d'obtenir des solutions finales de  $10^{-2}$  à  $10^{-5}$  par rapport au levain initial (500  $\mu$ L de la solution mère a été ajoutée à 4.5 mL de solution TS, après agitation 500  $\mu$ L de cette solution a été prélevée et ajoutée à 4.5 mL de solution TS et ainsi de suite jusqu'à la dilution  $10^{-5}$ ). Un volume de 50  $\mu$ L des dilutions a ensuite été étalée en triplicat à l'aide d'un rateau ou d'un ensemenceur à spirale (Easyspiral, Intersciences, Saint Nom, France) sur milieu gélosé YE (Yeast extract 1 % - Glucose 2 %). Les boîtes ont été laissées à température ambiante 2 à 3 jours, jusqu'à apparition des colonies. Les colonies présentes sur chaque boîte de pétri ont ensuite été dénombrées.

Pour chaque prélèvement de levain/pâte, 39 à 80 colonies (clones) ont été prélevées au hasard et étalées individuellement à l'aide d'un cône stérile sur milieu gélosé YE. Chaque colonie correspond à une souche. Au total, 2 102 souches ont été isolées dont 2 070 pour lesquelles l'espèce a été identifiée (Annexe S).

#### ○ Test des milieux de culture

Parallèlement, des tests de milieux, s'appuyant sur le nombre de colonies présentes par boîte après étalement selon le protocole préalablement décrit, ont été réalisés. Outre le milieu gélosé YE, un milieu « farine » et un milieu gélosé à l'extrait de malt (GEM) ont été testés.

#### ▪ Milieu « farine »

Pour se rapprocher au plus des conditions naturelles de l'écosystème « levain », nous avons testé un milieu contenant de la farine (2 % de farine T110 préalablement stérilisée au UV), avec un pH de 5. Avec ce milieu, les colonies étaient difficilement visibles. Nous avons donc choisi de ne pas l'utiliser.

#### ▪ Milieu GEM

Nous avons également testé la pousse sur un milieu gélosé à l'extrait de malt (GEM, 3 %). Le milieu GEM a été testé pour le répliquat cœur de pâte chez le boulanger 4. Il n'y a pas de différence significative entre le milieu GEM et le milieu YE (p-value = 0.84, Annexe 2). Nous avons choisi d'utiliser le milieu YE.

## **2.2. Stockage des souches**

Chacune des 2 102 souches isolées a été stockée dans du glycérol (17,4 %) à -80 °C à l'UMR de Génétique Végétale du Moulon. Ces souches restent vivantes et pourront être utilisées par la suite pour du phénotypage par exemple (Annexe S). Elles seront mises en conservation et à disposition de la communauté scientifique suite à leur dépôt dans la collection internationale de levure (CIRM-levures) et après autorisation du boulanger.

## **2.3. Méthode d'identification culturelle**

### **2.3.1. Extraction d'ADN**

#### ○ Extraction par plaque

Une méthode d'extraction d'ADN a été mise au point pour extraire par plaque 96 puits de l'ADN de qualité (Annexe 3). La paroi des levures a été détruite par l'action de la Zymolyase 20T (Euromedex, Souffelweyheim, France) pendant 1 heure à 37 °C. Puis, le protocole d'extraction en plaque deepwell 96 puits, utilisé en routine chez les plantes, a été suivi :

- étape de rupture des membranes plasmiques par des détergents (SDS) ;
- étape de déprotéinisation par précipitation à l'acétate de potassium ;
- purification de l'ADN sur colonne Whatman (Whatman, FlorhamPark, NJ).

La quantité et la qualité de l'ADN obtenu ont été vérifiées sur gel d'agarose 0,8 % après 30 mn de migration à 110 V. La visualisation de l'ADN, coloré au bleu de Bromophénol, a été possible grâce à du bromure d'éthidium (BET) qui s'intercale entre les brins d'ADN.

#### ○ Extraction par billes

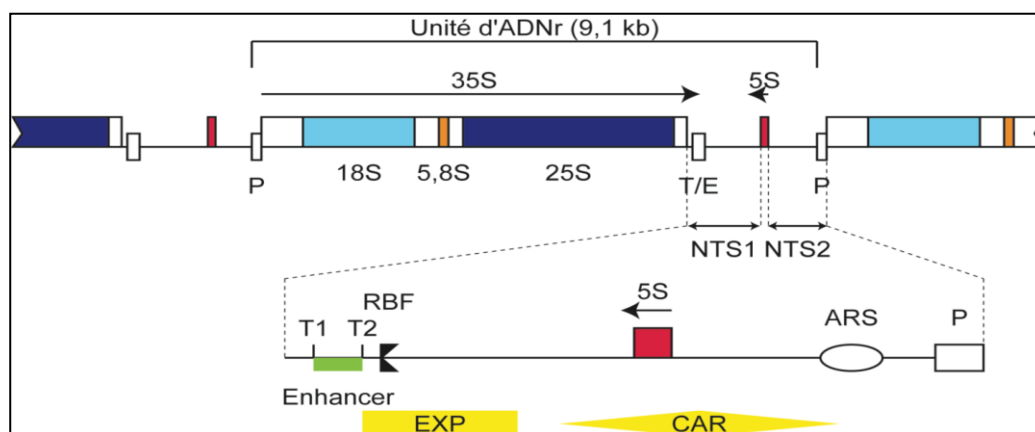
Pour vingt huit souches isolées dans la "pâte avant cuisson" du fournil 2, résistantes à l'extraction d'ADN décrite ci-dessus, une extraction par billes de verre inspirée de Burke, Dawson, et Stearns (2000) a été réalisée :

- Overnight d'une colonie en agitation à 30 °C dans 5 mL de milieu ;
- Centrifugation à 5 000 rpm pendant 5 minutes de la culture dans un tube eppendorf ;
- Lavage du culot avec 2 mL d'eau stérile ;
- Centrifugation à 5 000 rpm pendant 5 minutes ;
- Resuspension du culot dans 500 µL de tampon de lyse ;
- Ajout de billes de verres au 2/3 du tube et 25 µL de NaCl à 5M ;
- Mélange par vortex pendant 1 minute ;

- Repos quelques instants dans la glace puis mélange au vortex pendant 30 secondes ;
- Centrifugation à 2 000 rpm pendant 2 minutes ;
- Transfert du surnageant dans un tube propre ;
- Ajout de 500 µL de phénol, mélange au vortex puis centrifugation 1 minute à 2000 rpm ;
- Transfert du surnageant aqueux dans un tube propre puis ajout de 500 µL de SEVAG ;
- Mélange par vortex, centrifugation 1 min à 2 000 rpm ;
- Récupération de la phase aqueuse du dessus ;
- Ajout de 1 mL d'éthanol 95 % froid et précipiter durant 1 heure à 20 °C ;
- Centrifugation 5min à 14 000 rpm ;
- Laver le culot avec de l'éthanol à 70 %, centrifugation 5 minutes puis récupération du culot ;
- Resuspension du culot dans 250 µL de TE ;
- Ajout de 25 µL de EDTA-Sark et 5 µL de protéinase K (10 mg/mL) ;
- Incubation 45 minutes à 37 °C ;
- Ajout de 250 µL d'acétate d'ammonium ;
- Reprise des étapes 11 à 17 ;
- Resuspension dans 100 µL de TE.

### **2.3.2. PCR/RFLP de la région NTS**

L'identification des espèces de levures sur l'ensemble des échantillons a été effectuée sur la base des profils de digestion *AluI* de la région amplifiée des espaceurs intergéniques (NTS) de l'ADNr, une méthode couramment utilisée pour identifier les espèces de levure et développée par l'équipe de la collection statique internationale de levure française, le CIRM-Levures (Figure 3, Nguyen *et al.*, 2009). La région NTS a été amplifiée dans un mélange réactionnel de 50 µL contenant 0.5 µM de chaque amorce spécifique (SR21 et LR13, Nguyen *et al.*, 2009, Tableau 2, Invitrogen (Invitrogen, Cergy Pontoise, France)), 25-125 ng d'ADN, 0.2 mM de dNTP, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1,25 U de Taq polymérase maison et 1 X tampon Taq PCR (80 mM Tris-HCl [pH 8.8], 0.05% (v/v) Tween-20, 335 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Après une étape initiale de dénaturation à 94 °C pendant 4 minutes, 30 cycles d'amplification ont été réalisés : dénaturation à 94 °C pendant 30 secondes, hybridation des amorces à 48 °C pendant 30 secondes, élongation à 72 °C pendant 3 minutes. La dernière phase d'élongation a été réalisée à 72 °C pendant 5 minutes. La présence d'un produit PCR a ensuite été vérifiée par migration sur gel d'agarose 0.8 % à 130 volts pendant 60 minutes.



**Figure 3 :** Organisation des gènes d'ARNr chez *Saccharomyces cerevisiae* (extrait de Nguyen *et al.*, 2009).

**Tableau 2 :** Séquences des amorces olligonucléotidiques utilisées pour les amplifications PCR et le séquençage.

Amorce	Séquence oligonucléotidique (5' --> 3')	Taille séquence (bp)	Région/gène cible	Référence
SR21	CTTAATCTTTGAGACAAGC	2540	Non transcribed spacer (NTS)	Nguyen et al., 2009
LR13	CGATCTGCTGAGATTAAG			
NL1	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAG	550	gène26S, région D1/D2 de l'ADNr	O'Donnell, 1993
NL4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG			
CA5R	GTGAACAATGGATGGACGAGATTCTGTCG	800	gène <i>act1</i>	Kan, 1993
CA14	AACTGGGATGACATGGAGAAGATCTGGC			
58A2R	CTGCGTTCCTCATCGAT	375-650	Internal transcribed spacer (ITS1)	Martin & Rygielwicz, 2000
NSA3	AAACTCTGCTGCTGCTGGGGATA	975-1250	ITS1-5,8S-ITS2	
NLC2	GAGCTGCATTCCCAACAATC			

Pour chaque échantillon, 5 µL du produit PCR ont été digérés avec 2,5 U de l'enzyme de restriction *AluI* (site à bouts francs, 5'-AG↓CT-3' / 3'-TC↑GA-5', Promega, Charbonnières-les-Bains, France) et 1 X tampon de restriction pendant 1 heure à 37 °C. La température a ensuite été portée à 65 °C pendant 20 minutes pour inactiver totalement l'enzyme par dénaturation.

Les produits de la digestion ont été séparés sur gel d'agarose 1.2 % après migration à 130 volts pendant 1 heure. Ce pourcentage plus élevé en agarose permet en effet une meilleure séparation des petits fragments d'ADN digérés. Au total, 2 049 profils de digestion ont été observés.

### 2.3.3. Séquençage de la région D1/D2 de la sous unité 26S et du gène de l'Actine

Des profils de digestion similaires et/ou différents ont été observés au sein de chaque prélèvement. Nous avons choisi un à deux représentants par profil différent par fournil et par panification pour identifier les espèces présentes dans chaque prélèvement, en partant du postulat qu'un même profil de digestion correspondait à des individus de la même espèce. L'identification des espèces a été complétée sur 19 souches par séquençage de la région d'ADN ribosomique D1/D2, région 5' du gène 26S (Kurtzman & Robnett 2003, Tableau 2, voir Annexe 1 pour les profils) et sur 79 souches par

séquençage de *D1/D2* et de *ACT1* (Daniel & Meyer 2003 ; Kan 1993, Tableau 2). La région *D1/D2* est couramment utilisée pour identifier les espèces de levures ascomycètes (Kurtzman *et al.*, 2011) et est bien représentée dans la base de données non redondante (nr) nucléotidique (nt) du NCBI. Cette région diffère peu entre espèces proches, nous avons donc utilisé le gène *ACT1* pour affiner l'identification des souches mais ce gène ne permet pas une séparation claire entre certaines espèces proches (Daniel & Meyer 2003).

▪ *D1/D2* :

Pour chaque échantillon, 25-125 ng d'ADN ont été incubés dans un volume final de 50 µL d'un mélange réactionnel contenant 2 mM de dNTP, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.5 µM de chaque amorce (NL1 et NL4, Invitrogen (Invitrogen, Cergy Pontoise, France)), 1,25 U de Taq polymérase et 1 X de tampon (80mM Tris pH 8.8, 0.05 % (v/v) Tween-20, et 335 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Après une étape initiale de dénaturation à 94 °C pendant 4 minutes, 30 cycles d'amplification ont été réalisés comme suit : dénaturation à 94 °C pendant 30 secondes, hybridation à 54 °C pendant 40 secondes, élongation à 72 °C pendant 1 minute 30. La dernière phase de polymérisation a été réalisée à 72 °C pendant 1 minute 30.

▪ *ACT1* :

Pour chaque échantillon, 25-125 ng d'ADN ont été incubés dans un volume final de 25 µL d'un mélange réactionnel contenant 0.2 mM de dNTP, 0.2 µM de chaque amorce (Kan 1993, Invitrogen (Invitrogen, Cergy Pontoise, France)), 1 U de Takara Ex Taq DNA polymérase (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) et 1 X de tampon Ex Taq Takara. Après une étape initiale de dénaturation à 95 °C pendant 3 minutes, 30 cycles d'amplification ont été réalisés comme suit: dénaturation à 95 °C pendant 30 secondes, hybridation à 54 °C pendant 40 secondes, élongation à 72°C pendant 1 minute. La dernière phase de polymérisation a été réalisée à 72 °C pendant 7 minutes.

La présence d'un produit PCR a été vérifiée par migration sur gel d'agarose 0.8 % à 110 volts pendant 30 minutes. Les produits PCR ont été envoyés à la société Genoscreen (Lille, France) pour séquençage reverse et forward. Chaque séquence a été comparée aux séquences des bases de données NCBI (National Center for Biotechnology Information, Etats-Unis) et YeastIP grâce au logiciel BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) sur base nucléotidique (nt) non redondante (nr) pour déduire l'appartenance à l'espèce. Le seuil de 99 % de similarité entre les séquences nucléotidiques a

été retenu : une souche présentant 99 % de similarité de séquence ou plus avec une séquence de la base de données est considérée comme appartenant à la même espèce.

### 3. Analyses de diversité

La richesse spécifique a été calculée à partir du nombre d'espèces identifiées dans chaque échantillon de levain. La diversité spécifique a été mesurée à travers le calcul d'indices de diversité. Nous avons calculé trois indices de diversité alpha, qui mesurent la diversité intra-communauté à partir des données sur l'abondance des espèces identifiées (Marcon & Morneau 2010):

-L'**indice de Shannon** (Shannon & Weaver 1949), qui prend en compte la fréquence de chaque espèce. La formule est la suivante :

$$H = - \sum_{i=1}^s p_i \times \ln p_i$$

où  $p_i$  est la fréquence de l'espèce  $i$ .  $H$  tend vers 0 lorsqu'une seule espèce est présente dans l'échantillon ou si une espèce domine largement la communauté.  $H$  tend vers  $\ln$  du nombre total d'espèces de l'échantillon lorsque toutes les espèces de la communauté sont identifiées en même fréquence.

-L'**indice de Simpson** (Simpson 1949), qui estime la probabilité que deux individus tirés au hasard dans la communauté appartiennent à différentes espèces, a été calculé avec la formule suivante :

$$E = 1 - \sum_{i=1}^s p_i^2$$

où  $p_i$  est la fréquence de l'espèce  $i$ .  $E$  tend vers 0 lorsqu'une espèce domine la communauté et vers 1 lorsqu'il y a co-dominance de plusieurs espèces.

-L'**indice de richesse Chao1** (Chao 1984), qui estime la rareté des espèces. Le calcul a été réalisé avec la formule :

$$S = S_{obs} + \frac{F_1^2}{2F_2}$$

ou, si aucune espèce n'a été identifiée deux fois dans l'échantillon :

$$S = S_{obs} + \frac{F_1(F_1 - 1)}{2}$$

où  $S_{obs}$  est le nombre d'espèces observées dans l'échantillon,  $F_1$  le nombre d'espèces observées une fois et  $F_2$  le nombre d'espèces observées deux fois.  $S$  estime le nombre d'espèces présentes dans la communauté en prenant en compte les espèces identifiées un ou deux fois dans l'échantillon. Cet estimateur corrige le nombre d'espèces observées en fonction des espèces rares.

#### 4. Analyses non culturelles

Au cours de ma thèse, j'ai mis au point une méthode d'analyse de la diversité spécifique des champignons des levains par pyroséquençage (Roche GS FLX titanium) d'amplicons. Pour cela, l'amplicon et les amorces pour le pyroséquençage ont été choisis. Puis deux techniques ont été mises au point :

- Une méthode d'extraction d'ADN total de levain ;
- Une méthode d'amplification des amplicons.

Les bases de données pour l'assignation des espèces ont été complétées puis comparées entre elles. Enfin les résultats de pyroséquençage obtenus ont été comparés aux résultats obtenus avec la méthode de microbiologie classique (isolement et identification des souches selon profil de digestion de la région NTS puis séquençage de la région *D1/D2* complétée ou non par séquençage du gène *ACT1*).

##### 4.1. Préparation d'un levain synthétique

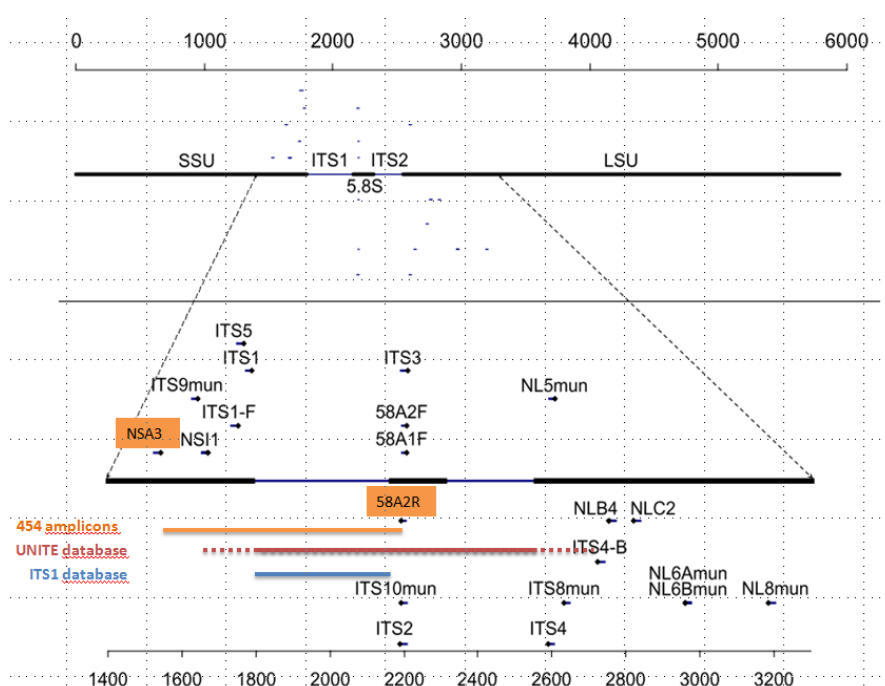
Afin de disposer d'un contrôle positif, nous avons créé un levain dit « synthétique » à partir de farine et de souches connues. Une souche représentant chaque espèce préalablement isolée et identifiée dans les levains de notre étude a été choisie (Tableau 4, colonne « levain synthétique »).

Chaque souche a été cultivée dans 5mL de milieu YE, à 30 °C pendant au moins 12 heures. Les colonies ont été dénombrées à l'aide d'un compteur Coulter (Beckman Coulter, Brea, CA USA): 5 à 20 µL de solution initiale ont été diluées dans 10 ou 20 mL de solution Coulter (Coulter® Isoton® II diluent, Beckman Coulter, Brea, CA USA, 8448011) avant le dénombrement. L'équivalent de  $10^7$  colonies/g de levain de chaque souche a été déposé dans un tube eppendorf. De la farine préalablement décontaminée aux ultraviolets a été ajoutée aux cellules de levures afin que le mélange pèse 0.76 g. De l'eau a été ensuite ajoutée, afin que le levain synthétique pèse 1 g. Le levain synthétique a ensuite été congelé à -20 °C pendant 10 jours.



## 4.2. Choix de l'amplicon

Grâce à une analyse bibliographique, la région ITS1 de l'ADN ribosomique a été choisie pour l'amplification. En effet, la région ITS (ITS1-5.8S-ITS2, Figure 4), communément utilisée dans l'étude des populations de champignons (Bridge *et al.*, 2005; Horton & Bruns 2001), répond bien à certaines contraintes des marqueurs moléculaires à savoir : être présente chez l'ensemble des organismes étudiés, présenter une forte diversité entre espèces et une faible diversité au sein d'une espèce (Gazis *et al.*, 2011; Lindahl *et al.*, 2013; Schoch *et al.*, 2012). Dans notre cas, nous étions également contraints par la taille des amplicons séquencés à ne travailler que sur l'un des deux ITS : nous avons choisi l'ITS1.



**Figure 4:** Localisation des amorces ITS dans la cassette ribosomale comprenant la petite sous-unité ribosomique (SSU), le premier espaceur intergénique (ITS1), la région 5.8S, le second espaceur intergénique (ITS2) et la grande sous-unité ribosomique (LSU) de l'ADN ribosomique (d'après Martin & Rygielwicz 2005). La position des séquences des amorces est représentée sur la figure : les amorces positionnées au dessus de la région amplifiée sont des amorces « en forward », au dessous sont des amorces « en reverse ». ITS1, ITS2, ITS3 et ITS4 sont issues de White *et al.*, 1990 ; les amorces ITS8mun, ITS10mun, NL5mun, NL6Amun, NL6Bmun, NL8Amun sont issues de Egger 1995; les amorces ITS1-F, ITS4-B sont issues de Gardes & Bruns 1993 et les autres amorces (NSA3, NS11, 58A1F, 58A2F, 58A2R, NLB4 et NLC2) sont issues de Martin & Rygielwicz 2005. L'échelle est en paire de bases, selon Gargas & DePriest 1996. Le système de nomenclature est décrit dans Martin & Rygielwicz 2005. En orange: taille et position des amplicons du pyrosequençage de cette étude; en rouge: taille et position des séquences de la base de données de référence UNITE; en bleu: taille et position des séquences de la base de données de référence ITS1.

Nous avons cherché quelles étaient les amorces qui, selon la littérature, amplifiaient l'ADN des champignons sans amplifier l'ADN des céréales. En effet, nos échantillons contenant une grande

quantité d'ADN de céréales, présente dans la farine, il a fallu sélectionner des amorces champignons-spécifiques. Pour cela, une analyse bibliographique a permis d'identifier 29 amorces (Tableau 3) permettant théoriquement d'amplifier les champignons.

**Tableau 3:** Liste des amorces ITS champignon, en 5' - 3'. “\_RC”= reverse complement.

Nom amorce	Séquence	Référence
ITS1F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	Orgiazzi <i>et al.</i> , 2013
ITS1-FL	CAAACCTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	Taylor <i>et al.</i> , 2008
ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC	Orgiazzi <i>et al.</i> , 2013
ITS5	TCCTCCGCTTATTGATATGC	Schoch <i>et al.</i> , 2012
ITS2r_RC	GCATCGATGAAGAACGCAGC	Orgiazzi <i>et al.</i> , 2013
ITS1F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	Gardes et Bruns 1993
ITS5f_RC	CCTTGTTACGACTTTTACTTCC	Bellemain <i>et al.</i> , 2010
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	Bellemain <i>et al.</i> , 2010
ITS4r	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	Schoch <i>et al.</i> , 2012
ITS4Br_RC	CTGGACCGTGTACAAGTCTCCTG	Bellemain <i>et al.</i> , 2010
ITS4r	TCCTCCGCTTATTGATATGC	Bellemain <i>et al.</i> , 2010
TW13r_RC	CGTCTTGAAACACGGACC	Taylor et Bruns 1999
TW13-64Pr_RC	CGTCTTGAAACACGGACCAAATGAACCACAAAGAAAC	Taylor <i>et al.</i> , 2008
TW13-67Pr_RC	CGTCTTGAAACACGGACCAAATCGGCGGCTAAGAAAC	Taylor <i>et al.</i> , 2008
TW13-102Pr_RC	CGTCTTGAAACACGGACCAAATAGTTACTAAAGAAAC	Taylor <i>et al.</i> , 2008
TW13-126Pr_RC	CGTCTTGAAACACGGACCAAACAGTGCTATGAAGAAAC	Taylor <i>et al.</i> , 2008
TW14r	GCTATCCTGAGGGAACTTC	Taylor & Bruns 1999
Ctb6f	GCATATCAATAAGCGGAGG	Taylor & Bruns 1999
Ctb6f_RC	CCTCCGCTTATTGATATGC	Taylor & Bruns 1999
ITS4r_RC	CCGTTTCCTTGCTATGTTCTTG	Gardes & Bruns 1993
NSI1	GATTGAATGGCTTAGTGAGC	Martin & Rygiewicz 2005
58AIF	GCATCGATGAAGAACGC	Martin & Rygiewicz 2005
58A2F	ATCGATGAAGAACGCAG	Martin & Rygiewicz 2005
NLB4_RC	GTCATAGAGGGTGAGAATCC	Martin & Rygiewicz 2005
58A2R	CTGCGTTCTTCATCGAT	Martin & Rygiewicz 2005
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	Kurtzman et Robnett 2003
ITS4_RC	GCATATCAATAAGCGGAGGA	Kurtzman & Robnett 2003
NLC2	GAGCTGCATTCCCAAACAACTC	Martin & Rygiewicz 2005
NSA3	AAACTCTGTCGTGCTGGGGATA	Martin & Rygiewicz 2005

Afin d'identifier le couple d'amorces le mieux adapté au milieu levain, c'est-à-dire celui qui serait à la fois champignon-spécifique et permettrait de bien décrire les populations de levures préalablement identifiées dans des levains, nous avons testé, par méthode BLAST, chacune des amorces sur une base de données créée pour l'étude. Cette base de données, réalisée à l'aide de la plateforme d'analyses bioinformatiques orientée web Galaxy, regroupe toutes les séquences ITS de la base de données nucléotidique non-redondante (nr/nt collection) du NCBI identiques à 80 % avec la séquence ITS1 et ITS2 de *S. cerevisiae* S288c (e-value =  $10^{-4}$  ; 80 % identité). Nous avons ajouté manuellement des représentants de céréales *Poaceae* telles que le blé et le seigle pour vérifier que les amorces ne s'hybridaient pas sur ces séquences. Cette base de données contient 1 995 séquences ITS. Les 29 amorces identifiées dans la littérature ont été alignées par BLAST sur la base de données préalablement créée (e-value =  $10^{-2}$  ; 80 % identité). Nous avons ainsi identifié cinq amorces qui permettaient théoriquement d'amplifier les champignons mais pas le blé ou le seigle : ITS4, NLB4 et NSI1 (Gardes & Bruns 1993) ainsi que NSA3 et 58A2R.

Deux couples (NSA3-NLC2 et NSA3-58A2R, Invitrogen (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) ont été testés pour l'amplification PCR de la région ITS sur 17 souches de boulangerie préalablement isolées et identifiées (amplification NTS et restriction enzymatique *Alu1*, séquençage des régions *D1/D2* et *ACT1*) de levain et trois espèces végétales : blé, maïs et nigelle (Tableau 4, colonne « test amorce »).

**Tableau 4 :** Liste des ADN testés pour le choix des amorces (test amorce) ; amplifiées et séquencées en Sanger (référence) ; utilisées pour l'élaboration du levain synthétique (levain synthétique, c'est-à-dire le levain 15) et ajoutées dans les bases de données de référence (ajout « UNITE » quand la séquence a permis de compléter la base de données « UNITE complétée » ; ajout « ITS1 » quand la séquence a permis de compléter la base de données « ITS1 complétée »). Souche nom : identifiant de la souche (Bi = identifiant du boulanger ; r = panification b ; LC = « levain chef » ; TP = « levain tout point » ; AC = « pâte avant cuisson » ; \_nombre = numéro de la souche. CBS et CLIM + numéro = identifiant des souches fournies par le CIRM levures).

Souche nom	identifiant	test amorce	représentant	levain synthétique	ajout UNITE	ajout ITS1
<i>Zea mays</i> lignée "B73"	maïs	x				
<i>Triticum aestivum</i> variété "courtot"	blé	x				
<i>Nigella damascena</i>	nigelle	x				
<i>Candida carpophila</i>	B1_TP_21	x	x	x	x	x
<i>Candida humilis</i>	B5r_TP1_1	x	x	x	x	x
<i>Candida humilis</i>	B5r_TP1_13	x	x			
<i>Hyphopichia Pseudoburtonii</i>	B1_TP_40	x	x	x	x	x
<i>Hyphopichia Pseudoburtonii</i>	CBS_2455a	x				
<i>Kazachstania bulderi</i>	B3_LC1_1	x	x			
<i>Kazachstania bulderi</i>	B3_TP1_1	x	x	x		
<i>Kazachstania exigua</i>	B2r_TP1_13	x	x			
<i>Kazachstania exigua</i>	B1r_TP1_1	x	x	x	x	x
<i>Kazachstania unispora</i>	B2_AC_10	x	x	x		
<i>Kazachstania unispora</i>	B2r_TP1_1	x	x		x	x
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	B2_AC_31	x	x			
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	B2_AC_37	x	x			
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	B2_AC_33			x	x	x
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	B1r_TP1_33	x	x	x	x	x
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	B5r_TP2_12	x	x			
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	B1_LC_1	x	x	x		
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	B1_AC_26	x	x			
<i>Candida carpophila</i>	CLIB1330 <sup>T</sup>		x		x	x
<i>Candida glabrata</i>	CLIB298 <sup>T</sup>		x		x	x
<i>Candida humilis</i>	CLIB1323 <sup>T</sup>		x		x	x
<i>Candida parapsilosis</i>	CLIB214 <sup>T</sup>		x		x	x
<i>Candida tropicalis</i>	CLIB315 <sup>T</sup>		x		x	x
<i>Hyphopichia burtonii</i>	CBS2352 <sup>T</sup>		x		x	x
<i>Kazachstania barnettii</i>	CLIB433 <sup>T</sup>		x			
<i>Kazachstania bulderi</i>	CLIB596 <sup>T</sup>		x		x	x
<i>Kazachstania exigua</i>	CLIB179 <sup>T</sup>		x		x	x
<i>Kazachstania unispora</i>	CLIB234 <sup>T</sup>		x			
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	CLIB515 <sup>T</sup>		x		x	x
<i>Millerozyma farinosa</i>	CLIB517 <sup>T</sup>		x		x	x
<i>Pichi kudriavzevii</i>	CLIB884 <sup>T</sup>		x		x	x
<i>Pichia occidentalis</i>	CBS5459 <sup>T</sup>		x			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CLIB227 <sup>T</sup>		x		x	
<i>Scheffersomyces stipitis</i>	CLIB187 <sup>T</sup>		x		x	x
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	CLIB230 <sup>T</sup>		x		x	x
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	CLIB284 <sup>T</sup>		x		x	x

La région ITS a été amplifiée dans un mélange réactionnel de 50 µL contenant 0.3 µM de chaque amorce spécifique (SR21 et LR13, Nguyen *et al.*, 2009, Invitrogen (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), 25-125 ng d'ADN, 0.2 mM de dNTP, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1,25U de Taq polymérase maison et 1 X tampon Taq PCR (80 mM Tris-HCl [pH 8.8], 0.05 % (v/v) Tween-20, 335 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Après une étape initiale de dénaturation à 95 °C pendant 10 minutes, 35 cycles d'amplification ont été réalisés : dénaturation à 95 °C pendant 30 secondes, hybridation des amorces à 60 °C pendant 40 secondes,

élongation à 72 °C pendant 40 secondes. La dernière phase d'élongation a été réalisée à 72 °C pendant 5 minutes. La présence d'un produit PCR a ensuite été vérifiée par migration sur gel d'agarose 0.8 % à 130 volts pendant 60 minutes.

Les deux couples d'amorces amplifiaient toutes les espèces isolées de levain mais le couple NSA3-NLC2 amplifiait également l'ADN de maïs : nous avons donc choisi le couple NSA3-58A2R pour le pyroséquençage d'amplicons.

#### **4.3. Extraction d'ADN total des levains**

Le kit d'extraction d'ADN PowerSoil MoBio (PowerSoil DNA isolation MoBio kit, Carlsbad, CA USA, 12888100) a été utilisé pour extraire l'ADN total des « levains tout point » du second prélèvement et l'ADN total du levain synthétique. Afin d'améliorer l'extraction d'ADN, les modifications suivantes ont été apportées au protocole préconisé par le fabricant : après ajout de la solution C1 à environ 200 mg de levain, les tubes du kit contenant les billes ont été mis 10 minutes à 65 °C ; un broyage vertical à une fréquence de 30 Hz a ensuite été réalisé à l'aide du TissueLyser II (Qiagen, Venlo, Pays-bas), pendant 5 minutes ; les tubes ont ensuite été positionnés dans la glace avant de poursuivre le protocole préconisé ; l'étape finale d'élution avec la solution C6 a été dédoublée : deux étapes successives avec ajout de 40 µL de solution et centrifugation pendant 30 secondes à 12 000 rpm ont été réalisées. La quantité d'ADN a ensuite été mesurée à l'aide d'un nanodrop (Nanodrop 2 000 UV-Vis Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA).

#### **4.4. Amplification PCR de la région ITS1**

L'amplification PCR a eu lieu en deux temps : l'amplification de l'ITS1 puis l'ajout des amorces taguées. Les produits d'amplification ont ensuite été purifiés et quantifiés avant le pyroséquençage.

##### **4.4.1. Amplification de la région ITS1**

Pour chaque échantillon, 100-200 ng d'ADN total de levain ont été incubés dans un volume final de 50 µL d'un mélange réactionnel contenant 10 mM de dNTP, 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.3 µM de chaque amorce (NSA3 et 58A2R), 2.6 U de Taq Expand High Fidelity (Roche Applied Science, Penzberg, Allemagne) et 1 X de tampon Expand High Fidelity. Deux cycles d'amplification ont été réalisés consécutivement : le premier avec les amorces ITS1, le second avec les amorces contenant les barcodes, afin de réduire les biais dus aux amplifications à partir d'amorces taguées (Berry *et al.*, 2011). Après une étape initiale de dénaturation à 95 °C pendant 2 minutes, 10 cycles d'amplification ont été réalisés comme suit : dénaturation à 95 °C pendant 15 secondes, hybridation à 60 °C pendant 30 secondes, élongation à 72 °C pendant 45 secondes. Une seconde série de 10 cycles d'amplification

a été réalisée comme suit : dénaturation à 95 °C pendant 15 secondes, hybridation à 60 °C pendant 30 secondes, élongation à 72 °C pendant 45 secondes plus 5 secondes à chaque cycle. La dernière phase de polymérisation a été réalisée à 72 °C pendant 7 minutes. La présence d'amplicons a été vérifiée par migration sur gel d'agarose à 0.8 % à 110 volts pendant 35 minutes.

#### **4.4.2. Ajout des amorces taguées**

L'ajout des amorces taguées nécessaires au pyroséquençage a été réalisé dans un deuxième temps. Les amorces contiennent la séquence clef de 25 nucléotides propre à la méthode de pyroséquençage utilisée (clef A d'Eurofins pour les amorces forwards, clef B pour les amorces reverses), une séquence barcode/taguée de 10 nucléotides spécifique à chaque échantillon pour les amorces reverses (MID-01 à 08 ; MID-10 et 11 ; MID-13 à 17) et l'amorce ITS1 préalablement validée (NSA3 pour les séquences forwards, 58A2R pour les séquences reverses, Tableau 5). La PCR a été réalisée dans un volume final de 50 µL contenant 10 mM de dNTP, 0.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.3 µM de chaque amorce (RISTspécifique à chaque levain et FITS1ad, purification HPLC, Eurofins, Tableau 5), 2.6 U de Taq Expand High Fidelity de chez Roche, 1 X de tampon Expand High Fidelity et 2 µL de solution PCR obtenue précédemment (3.6.3). Après une étape initiale de dénaturation à 95 °C pendant 2 minutes, 5 cycles d'amplification ont été réalisés comme suit : dénaturation à 95 °C pendant 15 secondes, hybridation à 60 °C pendant 30 secondes, élongation à 72 °C pendant 45 secondes. La dernière phase de polymérisation a été réalisée à 72 °C pendant 7 minutes. La présence d'amplicons a été vérifiée par migration sur gel d'agarose à 0.8 % à 110 volts pendant 35 minutes.

**Tableau 5 :** Nom et séquence des amorces taguées. En bleu : séquence clef spécifique à la méthode de pyroséquençage utilisée (clef A d'Eurofins pour les amorces forwards, clef B pour les amorces reverses). En rouge : barcode/tag spécifique à chaque échantillon (MID-01 à 08 ; 10 et 11 ; 13 à 17 d'Eurofins). Séquence en noir : séquence correspondant aux amorces ITS1 (NSA3 pour les séquences forwards ; 58A2R pour les séquences reverses).

Identifiant	nom amorce reverse	séquence amorce taguée reverse	nom amorce forward	séquence amorce taguée forward
SD_1	RITS1_MID1	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGACGAGTGCGTCTTCATCGAT	FITS1ad	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAAACTCTGTCGTGCTGGGGATA
SD_2	RITS1_MID2	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGACGCTCGACTGCGTCTTCATCGAT	FITS1ad	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAAACTCTGTCGTGCTGGGGATA
SD_3	RITS1_MID3	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGAGACGCACTCTGCGTCTTCATCGAT	FITS1ad	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAAACTCTGTCGTGCTGGGGATA
SD_4	RITS1_MID4	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGAGCACTGTAGCTGCGTCTTCATCGAT	FITS1ad	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAAACTCTGTCGTGCTGGGGATA
SD_5	RITS1_MID5	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGATCAGACACGCTGCGTCTTCATCGAT	FITS1ad	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAAACTCTGTCGTGCTGGGGATA
SD_6	RITS1_MID6	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGATATCGCGAGCTGCGTCTTCATCGAT	FITS1ad	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAAACTCTGTCGTGCTGGGGATA
SD_7	RITS1_MID7	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCGTGTCTCTACTGCGTCTTCATCGAT	FITS1ad	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAAACTCTGTCGTGCTGGGGATA
SD_8	RITS1_MID8	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCTCGCGTGCTCTGCGTCTTCATCGAT	FITS1ad	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAAACTCTGTCGTGCTGGGGATA
SD_9	RITS1_MID9	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTCTATGCGCTGCGTCTTCATCGAT	FITS1ad	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAAACTCTGTCGTGCTGGGGATA
SD_10	RITS1_MID10	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGATACGTCTCTGCGTCTTCATCGAT	FITS1ad	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAAACTCTGTCGTGCTGGGGATA
SD_11	RITS1_MID11	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCATAGTAGTGCTGCGTCTTCATCGAT	FITS1ad	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAAACTCTGTCGTGCTGGGGATA
SD_12	RITS1_MID12	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCGAGAGATACCTGCGTCTTCATCGAT	FITS1ad	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAAACTCTGTCGTGCTGGGGATA
SD_13	RITS1_MID13	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGATACGACGTACTGCGTCTTCATCGAT	FITS1ad	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAAACTCTGTCGTGCTGGGGATA
SD_14	RITS1_MID14	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCACGTACTACTGCGTCTTCATCGAT	FITS1ad	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAAACTCTGTCGTGCTGGGGATA
SD_15	RITS1_MID15	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCGTCTAGTACTGCGTCTTCATCGAT	FITS1ad	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAAACTCTGTCGTGCTGGGGATA

#### 4.4.3. Purification des amplifications et pyroséquençage

Pour chaque échantillon, une purification sur colonne a été réalisée grâce au kit MinElute PCR Purification Kit (Qiagen, 2006). Enfin, une étape d'évaporation au speed vacuum (Savant SPD IIIV Speed Vac Concentrator, Thermo Electron Corporation) a été réalisée pendant 20 minutes afin d'obtenir des concentrations proches de 60 ng/μL, mesurées grâce au nanodrop (Nanodrop 2 000 UV-Vis Spectrophotometer, Thermo Scientific, Tableau 6). Les amplicons des 15 levains, tagués par un MID spécifique à chaque levain, ont été envoyés séparément à Eurofins (Eurofins Genomics, Ebersberg, Allemagne) afin que soit effectué le mélange des échantillons dans les mêmes proportions (pooling) et le pyrosequençage titanium GS FLX sur ¼ de run, dans le sens reverse. En effet, l'amorce NSA3 se trouve dans la région SSU et permet d'en amplifier une partie, or le polymorphisme des séquences se trouve au niveau de l'ITS1, situé à une quinzaine de paires de base en amont de l'amorce reverse 58A2R. Compte tenu de la taille du séquençage des amplicons (650 pb environ) et de la faible information apportée par le séquençage en forward, nous avons choisi de séquencer en un seul sens : la reverse. Théoriquement, le séquençage sur ¼ de run permet de séquencer 100 000 à 200 000 reads, soient 6 666 à 13 333 reads par échantillons.

**Tableau 6 :** Concentrations des produits PCR finaux par échantillon.

Identifiant	Concentration amplicon (ng/μl)
SD_1	70,2
SD_2	61,7
SD_3	66,8
SD_4	68,6
SD_5	55,2
SD_6	59,6
SD_7	58,7
SD_8	60
SD_9	56,9
SD_10	65,4
SD_11	59
SD_12	56,4
SD_13	60,6
SD_14	58,8
levain synthétique (SD_15)	52,9



#### **4.5. Séquençage de souches isolées de boulangerie**

La région ITS1 de 34 souches préalablement isolées de levain ou de souches types d'espèces identifiées dans des levains (Tableau 4, colonne « représentant ») a été séquencée en Sanger par Genoscreen (Lille, France). Les séquences forward et reverse ont été alignées entre elles pour obtenir des séquences consensus dont certaines, les non-redondantes et non-inclues (Tableau 4, colonnes « ajout UNITE » et « ajout ITS1 »), ont été ajoutées aux bases de données pour l'assignation des séquences obtenues par pyroséquençage.

#### **4.6. Analyses bioinformatiques des données de pyroséquençage**

Les analyses bioinformatiques ont été réalisées à l'aide du package QIIME version 1.8.0 (Caporaso *et al.*, 2010).

##### **4.6.1. Observation de la qualité des séquences**

Pour vérifier la qualité des séquences, nous avons utilisé le logiciel FastQC, qui permet d'obtenir une vue d'ensemble de la qualité de nos séquences. Il nécessite l'emploi de fichier au format fastq, que nous avons obtenu avec l'outil « convert\_fastaqual\_fastq.py ». Le fichier .fastq a été analysé pour vérifier la qualité des séquences (encodées en Phred +33) des bases nucléotidiques notamment. Les notes de qualité par base étaient comprises entre 11 et 40 et correspondaient à la probabilité d'erreur d'identification de la base ( $11 = 1$  chance sur 110 que l'identification de la base soit erronée ;  $40 = 1$  chance sur 10 000 que l'identification de la base soit erronée).

##### **4.6.2. Démultiplexage et filtrage des séquences du pyroséquençage**

###### **Démultiplexage**

Toutes les séquences obtenues après le pyroséquençage, contenues dans un même fichier, ont dû être regroupées en fonction de leur origine (en fonction du levain dont elles provenaient). Pour cela, nous avons utilisé l'outil « split\_libraries.py » du package QIIME. Ce script prend en entrée le fichier de séquences et nécessite un fichier dit de « mapping » (Figure 5) que nous avons créé manuellement et qui contient le nom de l'échantillon, la séquence du MID qui identifie le levain et les séquences des amorces utilisées pour le pyroséquençage.

Les séquences ont été séparées selon le levain auquel elles appartenaient grâce au MID (barcode) associé. Cette étape permet également de filtrer les séquences sur la base de leur qualité selon les options choisies. Nous avons augmenté le nombre d'homopolymères autorisés dans la séquence à

une longueur de 8 au lieu de 6 (par défaut), car nous avons identifié un homopolymère T dans la séquence de l'espèce *K. bulderi*.

#SampleID	BarcodeSequence	LinkerPrimerSequence	Treatment	ReversePrimer
Sourdough.1	ACGAGTGCGT	CTGCGTTCTTCATCGAT	Baker	AAACTCTGTCGTGCTGGGGATA
Sourdough.2	ACGCTCGACA	CTGCGTTCTTCATCGAT	Baker	AAACTCTGTCGTGCTGGGGATA
Sourdough.3	AGACGCACTC	CTGCGTTCTTCATCGAT	Baker	AAACTCTGTCGTGCTGGGGATA
Sourdough.4	AGCACTGTAG	CTGCGTTCTTCATCGAT	Baker	AAACTCTGTCGTGCTGGGGATA
Sourdough.5	ATCAGACACG	CTGCGTTCTTCATCGAT	Baker	AAACTCTGTCGTGCTGGGGATA
Sourdough.6	ATATCGCGAG	CTGCGTTCTTCATCGAT	Baker	AAACTCTGTCGTGCTGGGGATA
Sourdough.7	CGTGCTCTTA	CTGCGTTCTTCATCGAT	Baker	AAACTCTGTCGTGCTGGGGATA
Sourdough.8	CTCGCTGTGC	CTGCGTTCTTCATCGAT	Baker	AAACTCTGTCGTGCTGGGGATA
Sourdough.9	TCTCTATGCG	CTGCGTTCTTCATCGAT	Baker	AAACTCTGTCGTGCTGGGGATA
Sourdough.10	TGATACGTCT	CTGCGTTCTTCATCGAT	Baker	AAACTCTGTCGTGCTGGGGATA
Sourdough.11	CATAGTAGTG	CTGCGTTCTTCATCGAT	Baker	AAACTCTGTCGTGCTGGGGATA
Sourdough.12	CGAGAGATAC	CTGCGTTCTTCATCGAT	Baker	AAACTCTGTCGTGCTGGGGATA
Sourdough.13	ATACGACGTA	CTGCGTTCTTCATCGAT	Baker	AAACTCTGTCGTGCTGGGGATA
Sourdough.14	TCACGTACTA	CTGCGTTCTTCATCGAT	Baker	AAACTCTGTCGTGCTGGGGATA
Sourdough.15	CGCTAGTAC	CTGCGTTCTTCATCGAT	Control	AAACTCTGTCGTGCTGGGGATA

Figure 5 : fichier de mapping

### Observation de la qualité des séquences démultiplexées

Une fois les séquences démultiplexées, nous avons à nouveau observé la qualité des séquences (par le même procédé qu'en 4.6.1).

Au regard des résultats de FastQC après avoir retiré les barcodes et les amorces lors du démultiplexage, les résultats ont confirmé que, pour conserver uniquement les bases nucléotidiques de bonne qualité de la séquence, il fallait couper les séquences en 3'. Deux critères sont possibles pour couper les séquences et les conserver selon la qualité de leurs bases : selon un critère de qualité des bases nucléotidiques ou en fonction de la taille de la séquence (ici: environ 450 nucléotides pour une note de qualité supérieure à 32).

### Nettoyage

Deux stratégies de coupage ont été réalisées : par qualité et par taille, grâce à l'outil PRINSEQ (Schmieder et Edwards 2011).

#### ○ Par qualité (32, 34 ou 36)

Les séquences "à droite" (en 3') ont été coupées pour le seuil de qualité 34 (commande perl « prinseq-lite.pl », option -trim\_qual\_right 34). D'autres notes de qualité ont été testées (32 et 36) mais les fichiers de sortie associés, observés en FastQC, présentaient un moins bon compromis entre la qualité finale des bases et la taille des séquences coupées (taille = 130 paires de bases (pb) à 547 pb pour un seuil de qualité de 32 ; 127 pb à 547 pb pour un seuil de qualité de 34 et 68 pb à 547 pb pour un seuil de qualité de 36).

- Par taille (400)

Les séquences "à droite" ont été coupées au delà de la 400ème base grâce à la commande perl « prinseq-lite.pl » et l'option -trim\_to\_len 400. D'après l'observation des fichiers de sortie en FastQC, les notes de qualité par base étaient meilleures avec que sans le coupage par taille (moyenne au dessus de 32, et un écart type correct au dessus de 30) car les séquences de mauvaise qualité ont pu être éliminées.

Les résultats du filtre selon la qualité permettaient d'obtenir des séquences plus grandes avec une moyenne de qualité satisfaisante, nous avons donc gardé les séquences coupées en dessous de la note de qualité 34, pour conserver un maximum de bases de bonne qualité par séquence.

#### **4.6.3. Assignment des séquences**

##### **Création des OTU et choix d'un représentant**

Les séquences présentant un pourcentage d'identité supérieur ou égal à 99 % d'identité entre elles ont été regroupées en unités fonctionnelles taxonomiques (Operational Taxonomic Unit (OTU) ; script « pick\_otus.py » de QIIME). Ce seuil d'identité a été choisi car la région ITS présente de fortes variations intraspécifiques. La création des OTU utilise uclust (Edgar 2010), la méthode par défaut. La séquence la plus fréquente de chaque OTU a été choisie comme représentant de l'OTU (script « pick\_rep\_set.py » de QIIME, -m most\_abundant).

##### **Préparation des bases de données de référence**

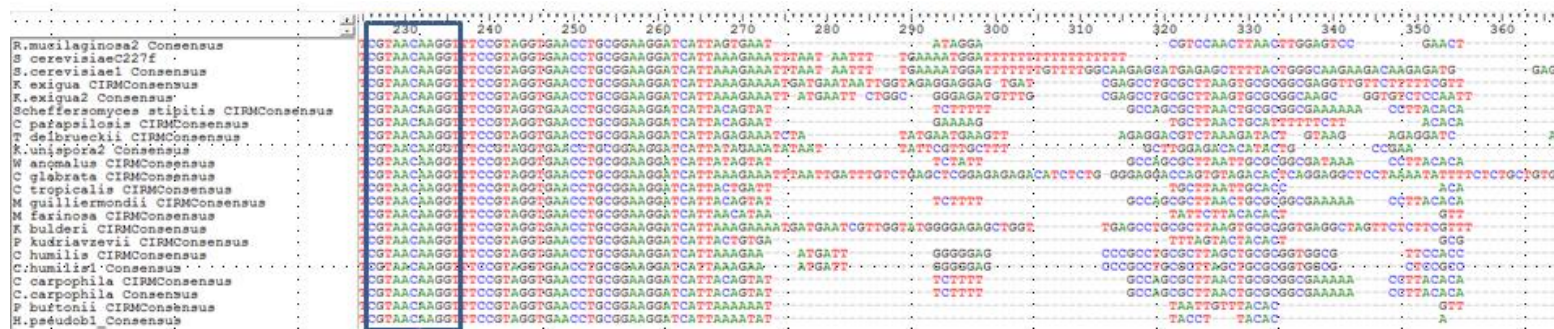
L'assignation des OTU correspond à l'alignement de la séquence de référence de chaque OTU sur des séquences ITS1 connues, contenues dans une base de données de référence. Nous avons identifié deux bases qui possédaient des séquences de référence ITS1 uniquement de champignons : la base de données UNITE+INSD et la base de données Uchime. Ces bases de données ont été complétées avec des séquences correspondant à des espèces préalablement identifiées dans des levains : soient des séquences de souches isolées et identifiées au cours de cette thèse, soient des séquences dont les souches ont été fournies par le CIRM-levures. Au total, quatre bases de données ont été testées pour les assignations :

- La **base de données « UNITE »** (17 253 séquences). Il s'agit de la base de données 97 % de UNITE (datant du 13/05/2014 et accessible à l'adresse suivante : [http://unite.ut.ee/sh\\_files/sh\\_qiime\\_release\\_13.05.2014.zip](http://unite.ut.ee/sh_files/sh_qiime_release_13.05.2014.zip)). Cette base, non redondante, contient l'ensemble de la région ITS (ITS1-5,8S-ITS2) et, selon les séquences, une partie de la petite et/ou grande sous-unité ribosomique de champignons. Les séquences correspondent à la séquence consensus pour chaque espèce hypothétique (SH), à un seuil de 97 % d'identité.

- La **base de données « UNITE complétée »** (17 253 séquences). Elle a été constituée à partir de deux bases au format QIIME :

- Les séquences ITS1 de 22 souches isolées de levain ou fournies par le CIRM, correspondant à des espèces préalablement identifiées dans du levain (colonne « ajout UNITE » du Tableau 4). Ces séquences ont été amplifiées avec les amorces utilisées pour le pyroséquencage, puis séquencées en Sanger. Pour éviter le biais dû à la présence d'une partie de la région SSU, bien conservée entre les espèces puisque codante pour la petite sous-unité ribosomique, les séquences ont été tronquées au niveau de la séquence CGTAACAAGGT (Figure 7) du SSU. Seules les séquences non redondantes et non incluses ont été ajoutées (22 séquences).
- Les séquences de la base de données 97 % de UNITE (datant du 13/05/2014 et accessible à l'adresse suivante : [http://unite.ut.ee/sh\\_files/sh\\_qiime\\_release\\_13.05.2014.zip](http://unite.ut.ee/sh_files/sh_qiime_release_13.05.2014.zip))

Les fichiers de taxonomie ont été combinés (fichier « UNITE\_completee\_taxo.txt »).



**Figure 7:** Alignement des séquences ITS1 de levain et du CIRM et région tronquée avant ajout dans la base de données « UNITE complétée » (carré en bleu = séquence nucléotidique de la région SSU à partir de laquelle les séquences ont été tronquées en 5').

- La **base de données « ITS1 »** (20 994 entrées). Il s'agit de la base de données ITS1x de Uchime (datant du 03/07/2014 ; uchime\_sh\_refs\_dynamic\_develop\_985\_03.07.2014.ITS1.fasta), produite grâce au logiciel ITSx (Bengtsson-Palme *et al.*, 2013) qui permet de sélectionner les séquences ITS1 exclusivement. Le logiciel ITSx, écrit en langage Perl, permet d'identifier et d'extraire pour chaque séquence l'ITS1 ou l'ITS2 (ici: l'ITS1). La base de données Uchime est habituellement utilisée pour identifier et extraire les chimères de données de séquençage, elle contient de la redondance (plusieurs séquences pour une même espèce et des séquences nucléotidiques identiques avec des identifiants différents).
- La **base de données « ITS1 complétée »** (21 015 entrées). Elle a été constituée à partir de deux bases au format QIIME :

- Les séquences ITS1 de 21 souches isolées de levain ou données par le CIRM-levures (colonne « ajout ITS1 » du Tableau 4), préalablement soumises au logiciel ITSx ([microbiology.se/sw/ITSx\\_1.0.9.tar.gz](http://microbiology.se/sw/ITSx_1.0.9.tar.gz)). (Une des séquences correspondant à l'espèce *S. cerevisiae*, contenant moins de 80 pb après la sélection de l'ITS1 par le logiciel ITSx n'a pas été ajoutée à la base.)
- Les séquences de la base de données ITS1 (datant du 03/07/2014 ; `uchime_sh_refs_dynamic_develop_985_03.07.2014.ITS1.fasta`).

Les fichiers de taxonomie ont été combinés (fichier « ITS1\_completee\_taxo.txt »).

### Assignment

La méthode « RDP classifier » (Wang *et al.*, 2007) a été utilisée pour assigner le représentant de chaque OTU à une séquence de chaque base de données de référence (script « `assign_taxonomy.py` » de QIIME, option `-m rdp`, version 2.2 de RDP classifier, pour plus d'informations sur cette méthode voir <http://sourceforge.net/projects/rdp-classifier/> et Wang *et al.*, 2007). RDP classifier est une méthode bayésienne qui permet d'assigner rapidement des séquences nucléotidiques, avec une estimation de la confiance de chaque assignation comprise entre 0 (séquence jamais assignée) et 1 (assignée sans équivoque). Le principe de cette méthode est de découper les séquences en mots et de calculer pour chaque séquence à assigner une probabilité d'appartenance à une classe de la base de référence selon la distribution des mots dans les séquences. La séquence est assignée à la classe de référence qui maximise la probabilité et un indice de confiance de l'assignation est estimé par bootstrap (Wang *et al.*, 2007).

### Composition taxonomique de chaque levain

Afin de déterminer la composition taxonomique de chaque levain, nous avons créé un tableau des OTU (scripts « `make_otu_table.py` », « `biom summarize-table` », puis « `summarize_taxa_through_plots.py` », de QIIME). Ce tableau indique à la fois le nombre de séquences de l'OTU identifié pour chaque levain et la taxonomie associée à l'OTU.

#### 4.6.4. Analyses de la diversité

##### Calcul des indices de diversité alpha

Afin de calculer les indices de diversité alpha de chaque levain (indices de Simpson, de Shannon, Chao1, la diversité phylogénétique (PD whole tree), et la richesse spécifique), les OTU ont d'abord été sous échantillonnés (script « `multiple_rarefactions.py` » de QIIME), puis la diversité alpha de

chaque échantillon d'OTU a été calculée (script « alpha\_diversity.py » de QIIME) enfin, les résultats ont été regroupés/concaténés pour générer des graphes de raréfaction (« collate\_alpha.py » puis make\_rarefaction\_plots.py de QIIME) .

### **Calcul des indices de diversité bêta**

La diversité bêta, c'est à dire la diversité entre levains, a été étudiée en utilisant l'indice Unifrac, classiquement utilisé pour estimer des distances entre communautés en prenant en compte les distances phylogénétiques entre taxons sur un sous-échantillonnage de 7 300 séquences (Lozupone & Knight 2005; scripts beta\_diversity\_through\_plots.py puis jackknifed\_beta\_diversity.py de QIIME, option -e 7300).

Les distances entre les levains ont été visualisées sur un arbre construit par la méthode UPGMA (script make\_bootstrapped\_tree.py de QIIME, options -m master\_tree.tre, -s jackknife\_support.txt).

### **5. Données de phénotypage**

Les données de phénotypage ont été réalisées sur 35 souches appartenant aux sept espèces majoritairement identifiées dans les levains français étudiés au cours de cette thèse: *C. humilis*, *K. bulderi*, *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii*, *K. barnettii*, *K. exigua* et *K. unispora* (Tableau 7). Une souche de référence ainsi qu'une à six souches isolées de levains français ont été analysées pour chaque espèce. Les souches analysées ont été striées sur boîte YE (1% Bacto yeast extract 1 % (MOBIO Ref 12110-03), 2% glucose (ACROS Ref 410950010)) à partir de la collection en stock (voir paragraphe Stockage des souches).

**Tableau 7** : Souches et phénotypage associé. SD = croissance sur milieu minimum; Gly = croissance sur milieu glycérol; SPO = observation après croissance en milieu de sporulation SPO, MC = observation après croissance sur milieu de sporulation Mac Clary; API = analyse du profil d'assimilation des sucres; FACS = analyse de la taille du génome par cytométrie de flux; taille cellule = analyse de la taille des cellules de la souche par cytométrie de flux.

identifiant	statut	espèce	SD	Gly	SPO	MC	API	FACS	taille cellule
CLIB 227 <sup>T</sup>	reference	<i>S. cerevisiae</i>	x	x	x		x	x	x
B7_13	levain		x	x	x		x	x	x
B5r_TP2_12	levain		x	x	x		x	x	x
B1r_TP_33	levain		x	x	x		x	x	x
B9_2	levain								x
B10_L_8	levain							x	x
CLIB 230 <sup>T</sup>	reference	<i>T. delbrueckii</i>	x	x	x		x	x	x
B1_AC_26	levain		x	x	x		x	x	x
B1_LC_1	levain		x	x	x		x	x	x
B14_36	levain		x	x	x		x	x	x
B14_10	levain							x	x
B14_12	levain							x	
CLIB 596 <sup>T</sup>	reference	<i>K. bulderi</i>	x	x	x		x	x	x
B3_TP1_20	levain		x	x	x	x	x	x	x
B4_TP1_12	levain		x	x	x	x	x	x	x
B12_7	levain		x	x	x		x	x	x
B3_AC1_32	levain		x	x	x	x			x
B3r_TP1_1	levain							x	
B4r_TP1_1	levain							x	
CLIB1323 <sup>T</sup>	reference	<i>C. humilis</i>	x	x	x		x	x	x
B5_AC1_19	levain		x	x	x	x	x		x
B7_1	levain		x	x	x	x	x	x	x
B8_10	levain		x	x	x		x	x	x
B5_TP1_20	levain					x		x	x
B6_2	levain							x	x
B11_1	levain							x	x
CLIB433 <sup>T</sup>	reference	<i>K. barnettii</i>						x	x
B13_6	levain					x			x
B14_22	levain							x	
CLIB179 <sup>T</sup>	reference	<i>K. exigua</i>						x	x
B1r_TP_1	levain					x		x	x
B2_TP1_4	levain					x		x	x
CLIB234 <sup>T</sup>	reference	<i>K. unispora</i>						x	x
B2_AC_10	levain					x		x	x
B2_TP_8	levain							x	x

### 5.1. Assimilation des sucres

Seize souches (colonne API, Tableau 7) ont subi en triplicat des tests d'assimilation de sucres, à l'aide de canaux API 20 C AUX (bioMérieux, Durham, USA ; Tableau 8) en suivant le protocole préconisé. Les résultats ont été notés à 48 heures puis 72, et éventuellement à 120 heures si aucune fermentation n'avait été observée à 72 heures.

**Table 8:** Substrats testés grâce aux galeries API utilisées

TESTS	SUBSTRATS	QTE (mg/cup.)
0	Aucun	-
GLU	D-GLUcose	1,2
GLY	GLYcérol	1,2
2KG	calcium 2-céto-Gluconate	1,2
ARA	L-ARAbinose	1,2
XYL	D-XYLose	1,2
ADO	ADOnitol	1,2
XLT	XyLiTol	1,2
GAL	D-GALactose	1,9
INO	INOsitol	2,36
SOR	D-SORbitol	1,2
MDG	Méthyl- $\alpha$ D-Glucopyranoside	1,2
NAG	N-Acétyl-Glucosamine	1,2
CEL	D-CELLobiose	1,2
LAC	D-LACtose (origine bovine)	1,2
MAL	D-MALTose	1,2
SAC	D-SACcharose	1,2
TRE	D-TREhalose	1,2
MLZ	D-MéLÉZitose	1,2
RAF	D-RAFfinose	1,9

### 5.2. Milieu minimum

Dix-sept souches (colonne SD, Tableau 7) ont été déposées à l'aide d'un cure-dent sur milieu SD (2 % glucose (ACROS Ref 410950010), 0.67 % de Yeast Nitrogen Base w/o acides aminés et sulfate (DIFCO Ref 233520), 0.5 % de sulfate d'ammonium (MERCK Ref 1.01217.1000), 2 % d'agar), en duplicat. Les colonies ont été observées après 3 jours d'incubation à 30 °C.

### 5.3. Milieu glycérol

Dix-sept souches (colonne Gly, Tableau 7) ont été déposées à l'aide d'un cure-dent sur milieu glycérol (Bacto yeast extract 1 % (MOBIO Ref 12110-03), Bacto-pepetone 2 %, glycerol 3 %, agar 2 % (mOBIO Ref 12112-1)), en duplicat. Les colonies ont été observées après 3 jours d'incubation à 30 °C.

### 5.4. Milieu de sporulation

Deux tests de sporulation ont été effectués: un sur milieu SPO, un sur milieu McClary.

Dix-sept souches (colonne SPO, Tableau 7) ont été déposées à l'aide d'un cure-dent sur milieu SPO (acétate de potassium 1 %, Bacto yeast extract 0.25 % (MOBIO Ref 12110-03), glucose 0.1 % (ACROS



Ref 410950010), agar 2 % (mOBIO Ref 12112-1)), en duplicat. Les colonies ont été observées au microscope après 15 et 76 jours d'incubation à 30 °C.

Dix souches (colonne MC, Tableau 7) ont été déposées sur milieu McClary (glucose 0.1 %, chlorure de potassium 0.18 %, acétate de sodium 0.82 %, Bacto yeast extract 0.25 %, agar 0.15 %). Les résultats associés (Chapitre 4) ont été obtenus par Noémie Jacques, du CIRM-levures.

### **5.5. Taille du génome**

Trente-et-une souches (colonne FACS, Tableau 7) ont été analysées par cytométrie en flux (FACS) pour déterminer leur ploïdie et leur contenu en ADN. Les cellules ont été fixées et marquées avec un agent intercalant de l'ADN : l'iodure de propidium en début de phase stationnaire grâce au protocole suivant:

Jour 1 : Déstockage des souches

- Déstockage des souches sur milieu solide YPglu.
- Incubation 24 à 48 heures à 30 °C (jusqu'à obtention de colonies isolées de 1 à 2 mm).

Jour 2 : Pré-culture des cellules

- Ensemencement de 5 ml de milieu YPglu avec plusieurs colonies, à une concentration de 2.10<sup>6</sup> cellules/ml
- Incubation 12 heures à 30 °C (agitation 160 rpm)
- Préparation, pour chaque culture, d'un tube de 15 ml contenant 2,3 ml d'EtOH absolu et conservation jusqu'au lendemain à 4 °C afin que les cellules soient au début de la phase stationnaire pour déterminer leur ploïdie.

Jour 3 : Culture et fixation des levures

- Mesure de la DO des cultures
- Prélèvement de 1 ml de culture et le fixer dans 2,3 ml d'EtOH absolu à 4 °C
- Incubation pendant 12 heures à 4 °C pour assurer une bonne fixation des cellules

Jour 4 : Traitement RNase

- Centrifugation des cellules fixées dans l'EtOH (4 000 rpm, 4 minutes, 4 °C)
- Reprise du culot dans 1 ml de sodium citrate 50 mM, pH 7
- Centrifugation des cellules (4 000 rpm, 4 minutes, 4 °C)
- Reprise des cellules dans le sodium citrate (50 mM, pH7) à concentration finale de 1.10<sup>7</sup> cellules/ml
- Prélèvement d'un aliquote de 100 µl et transfère en tube Eppendorf 1,5 ml
- Ajout de 1 µl de RNase A (100 mg/ml) et incubation pendant 2 heures à 37 °C. Les cellules ainsi traitées peuvent être conservées à 4 °C jusqu'à leur marquage (jusqu'à 2 semaines).

Jour 5 : Marquage des cellules et analyse FACS

- Ajout de 400 µl de la solution de marquage aux 100 µl de cellules traitées à la RNase :
    - Sodium de citrate (50 mM, pH7)
    - Iodure de propidium (50 µg/ml final)
  - Incubation pendant 40 minutes, à l'obscurité.
  - Centrifugation des tubes (13 000rpm, 10 minutes), re-suspension du culot dans 100 µl d'une solution de sodium citrate 50 mM, pH7.
- Les échantillons, conservés à l'obscurité, ont ensuite été analysés au FACS.

### **5.6. Taille des cellules**

La taille des cellules de 31 souches (colonne taille cellule, Tableau 7) a été mesurée au cytomètre de flux en phase exponentielle après 6 heures de culture dans du YPD 2 % glucose. Les tailles ont été obtenues à partir d'une gamme étalon réalisée à partir de billes de taille variable (2 microns, 3.4, 5.1, 7.4, 10.5). La taille des singletons a été mesurée sur un minimum de 20 000 évènements (20 000 singletons). Une répétition de lecture au cytomètre de flux a été effectuée. Pour deux souches, une répétition de culture et de mesure a été réalisée.

## **6. Analyses statistiques**

### **6.1. Analyses descriptives de la densité des levures et LAB et des propriétés chimiques du levain**

Une Analyse en Composantes Principales (ACP) a été réalisée pour mettre en évidence les relations entre les dénombrements des microorganismes (LAB et levures) et les propriétés biochimiques de la pâte. Toutes les variables biochimiques (mesures de pH, acidité lactique et acétique et l'acide total titrable (TTA)), ainsi que le log des moyennes de dénombrement des LAB et des levures et le ratio LAB/levures (uniquement dans le Chapitre 2) d'un ou de chaque réplicat de pâte ont été analysés. Des modèles linéaires simples ont été écrits pour tester si le pH et le TTA étaient liés à la moyenne des dénombrements de microorganismes (LAB ou levures) au cours d'un processus de panification. Le package PCA de R a été utilisé pour cette analyse (<http://www.r-project.org/>).

### **6.2. Analyses des densités de levures et de LAB pour cinq fournils**

Afin d'identifier les différentes sources de variations de la densité de levures ou de LAB, nous avons modélisé leur densité (sur une échelle log) par un modèle linéaire mixte.

Les échantillons ayant été étalés sur les boîtes de pétri par deux méthodes différentes (de façon automatique avec l'ensemenceur à spirale pour les levains ou au râteau, manuellement (pour les

levains des fours 3 et 5)), l'effet du four et la méthode d'étalement sont partiellement confondus. Pour limiter la surestimation de l'effet four, la méthode d'étalement a été prise en compte dans le modèle.

Le modèle complet que nous avons utilisé est le suivant :

$$Y_{ijklmn} = \mu + \alpha_i + \beta_j + B_k + D_{l(k)} + R_{m(jkl)} + \varepsilon_{ijklmn}$$

où  $Y_{ijklmn}$  est le dénombrement  $n$  ( $n=1$  à 3) en log des LAB (ou des levures) de l'échantillon de pâte  $m$  ( $m = 1$  à 2) en fonction de l'étape du processus de panification  $j$  ( $j = 1$  à 4) au cours du processus de panification  $l$  ( $l = 1; 2$ ) dans le four  $k$  ( $k = 1; 5$ ) étalé selon la méthode manuelle ou automatique  $i$  ( $i = 1; 2$ ). La méthode d'étalement et l'étape du processus de panification sont prises en compte comme des effets fixes du modèle ( $\alpha_i$  et  $\beta_j$ , respectivement). Le four, le processus de panification et le réplicat de pâte sont des effets aléatoires gaussiens du modèle ( $B_k$ ,  $D_{l(k)}$  et  $R_{m(jkl)}$ , respectivement) avec une variance notée  $\sigma^2_B$ ,  $\sigma^2_D$  et  $\sigma^2_R$ , respectivement. Les résidus  $\varepsilon_{ijklmn}$  du modèle sont considérés comme identiquement et indépendamment distribués selon une loi normale  $N(\mu, \sigma^2)$ . Les effets fixes et aléatoires du modèle ont été testés en comparant le modèle incluant le facteur testé au sous-modèle n'incluant pas le facteur testé, avec un niveau de significativité de 5 %. Pour les effets aléatoires, la vraisemblance du modèle sous l'hypothèse nulle a été estimée par simulation. Pour comparer les moyennes de dénombrement entre les différentes étapes du processus de panification, un test de Tukey a été réalisé. Pour estimer les paramètres du modèle, les algorithmes REML ont été utilisés. Pour les tests, l'algorithme ML a été utilisé. L'ensemble de ces analyses statistiques a été réalisé avec les packages R nlme et multcomp (<http://www.r-project.org/>).

### 6.3. Analyses des pratiques de panification

Afin d'identifier les liens entre les différentes pratiques de panification (Tableau 1), nous avons effectué une Analyse des Correspondances Multiples (ACM). Les données manquantes ont été regroupées dans une classe à part pour chaque variable. Nous avons également réalisé des tests exacts de Fisher deux à deux, entre toutes les variables. La p-value a ensuite été ajustée par la méthode de « false discovery rate » (Benjamini & Hochberg 1995). Les variables ont été recodées de la façon suivante :

- La variable conservation du "levain chef" a été recodée en deux classes: TA quand le levain était conservé à température ambiante entre deux rafraichis; froid quand le levain était conservé au froid entre deux rafraichis (toujours ou parfois) ;

- La variable âge du levain a été recodée en trois classes : 1 quand le levain avait moins de deux ans ; 10 quand le levain avait entre deux et 10 ans ; 20 quand le levain avait plus de 20 ans ;
- La variable origine du levain a été recodée en deux classes : levain lorsque un morceau de levain de la fournée précédente était à l'origine du nouveau chef ; pâte lorsque un morceau de pâte à pain (et de levain, éventuellement) de la fournée précédente était à l'origine du nouveau chef ;
- La variable pourcentage de levain a été recodée en trois classes : 1 quand le levain représentait moins de 10 % de la pâte à pain ; 10 quand le levain représentait entre 11 % et 19 % de la pâte à pain ; 20 quand le levain représentait plus de 20 % de la pâte à pain ;
- La variable nombre de journées de panification par semaine a été recodée en trois classes : 1 lorsqu'une à deux journées de panification étaient effectuées par semaine dans le fournil ; 3 quand trois à quatre journées de panification étaient effectuées par semaine dans le fournil ; 5 quand plus de cinq journées de panification étaient effectuées par semaine dans le fournil ;
- La variable nombre de rafraichis entre deux processus de panification a été recodée en trois classes : 1, 2 ou 3 (quand plus de trois rafraichis avaient lieu entre deux processus de panification).

La moyenne des rafraichis par semaine a été calculée et recodée en deux classes : 1 quand il y avait moins de sept rafraichis par semaine ; 7 quand il y avait plus de sept rafraichis par semaine.

Les groupes identifiés par l'ACM ont ensuite été comparés à l'aide de tests de Fisher. La p-value a été ajustée par la méthode de « false discovery rate ».

#### 6.4. Analyses des densités de levures pour 14 fournils

Des modèles linéaires mixtes ont été comparés pour analyser la variation de la densité des levures, en  $\log_{10}$  selon différents effets :

- L'effet fixe de la position du réplicat dans la pâte (cœur ou bord de la pâte)  $\alpha_i$ ;
- L'effet fixe du groupe (déterminé par l'ACM et regroupant les fournils selon la typologie des pratiques de panification)  $\beta_j$ ;
- L'effet aléatoire du fournil  $B_k$ ;
- L'effet aléatoire du réplicat de pâte (effet emboité dans l'effet fournil)  $R_{m(k)}$ .

Le fournil et le réplicat de pâte sont des effets aléatoires gaussiens du modèle (respectivement  $B_k$  et  $R_{m(k)}$ ) avec une variance notée  $\sigma_B^2$  et  $\sigma_R^2$ . Les résidus des modèles sont considérés comme identiquement et indépendamment distribués selon une loi normale  $N(\mu, \sigma^2)$ . Les effets fixes et

aléatoires du modèle ont été testés en comparant le modèle incluant le facteur testé au sous-modèle n'incluant pas le facteur testé, avec un niveau de significativité de 5 %. Pour les effets aléatoires, la vraisemblance du modèle sous l'hypothèse nulle a été estimée par simulation. Pour estimer les paramètres du modèle, les algorithmes REML ont été utilisés. Pour les tests, l'algorithme ML a été utilisé. L'ensemble de ces analyses statistiques a été réalisé avec les packages R nlme et multcomp (<http://www.r-project.org/>).

## BIBLIOGRAPHIE

- Bellemain, Eva, Tor Carlsen, Christian Brochmann, Eric Coissac, Pierre Taberlet, et Håvard Kauserud. 2010. « ITS as an Environmental DNA Barcode for Fungi: An in Silico Approach Reveals Potential PCR Biases ». *BMC Microbiology* 10 (1): 189. doi:10.1186/1471-2180-10-189.
- Bengtsson-Palme, Johan, Martin Ryberg, Martin Hartmann, Sara Branco, Zheng Wang, Anna Godhe, Pierre De Wit, *et al.*, 2013. « Improved Software Detection and Extraction of ITS1 and ITS2 from Ribosomal ITS Sequences of Fungi and Other Eukaryotes for Analysis of Environmental Sequencing Data ». *Methods in Ecology and Evolution* 4 (10): 914-19. doi:10.1111/2041-210X.12073.
- Benjamini, Y., et Y. Hochberg. 1995. « Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing ». *Journal of The Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 57 (1): 289-300.
- Bridge, P. D., B. M. Spooner, et P. J. Roberts. 2005. « The Impact of Molecular Data in Fungal Systematics ». In *Advances in Botanical Research*, édité par J.A. Callow, Volume 42:33-67. Advances in Botanical Research Incorporating Advances in Plant Pathology. Academic Press. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065229605420029>.
- Burke, Dan, Dean Dawson, et Tim Stearns. 2000. *Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*. CSHL Press.
- Caporaso, J. Gregory, Justin Kuczynski, Jesse Stombaugh, Kyle Bittinger, Frederic D. Bushman, Elizabeth K. Costello, Noah Fierer, *et al.*, 2010. « QIIME Allows Analysis of High-Throughput Community Sequencing Data ». *Nature Methods* 7 (5): 335-36. doi:10.1038/nmeth.f.303.
- Chao, Anne. 1984. « Nonparametric estimation of the number of classes in a population. » *Scandinavian Journal of statistics*, 265-70.
- Daniel, H. M., et W. Meyer. 2003. « Evaluation of Ribosomal RNA and Actin Gene Sequences for the Identification of Ascomycetous Yeasts ». *International Journal of Food Microbiology* 86 (1-2): 61-78. doi:10.1016/S0168-1605(03)00248-4.
- Edgar, Robert C. 2010. « Search and Clustering Orders of Magnitude Faster than BLAST ». *Bioinformatics* 26 (19): 2460-61. doi:10.1093/bioinformatics/btq461.
- Egger, Keith N. 1995. « Molecular analysis of ectomycorrhizal fungal communities ». *Canadian Journal of Botany* 73 (S1): 1415-22. doi:10.1139/b95-405.
- Gardes, M., et T. D. Bruns. 1993. « ITS Primers with Enhanced Specificity for Basidiomycetes - Application to the Identification of Mycorrhizae and Rusts ». *Molecular Ecology* 2 (2): 113-18. doi:10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x.
- Gargas, Andrea, et Paula T. DePriest. 1996. « A Nomenclature for Fungal PCR Primers with Examples from Intron-Containing SSU rDNA ». *Mycologia* 88 (5): 745. doi:10.2307/3760969.

- Gazis, Romina, Stephen Rehner, et Priscila Chaverri. 2011. « Species Delimitation in Fungal Endophyte Diversity Studies and Its Implications in Ecological and Biogeographic Inferences ». *Molecular Ecology* 20 (14): 3001-13. doi:10.1111/j.1365-294X.2011.05110.x.
- Horton, Thomas R., et Thomas D. Bruns. 2001. « The Molecular Revolution in Ectomycorrhizal Ecology: Peeking into the Black-Box ». *Molecular Ecology* 10 (8): 1855-71. doi:10.1046/j.0962-1083.2001.01333.x.
- Kan, Virginia L. 1993. « Polymerase Chain Reaction for the Diagnosis of Candidemia ». *Journal of Infectious Diseases* 168 (3): 779-83. doi:10.1093/infdis/168.3.779.
- Kurtzman, Cletus, J. W. Fell, et Teun Boekhout. 2011. *The Yeasts: A Taxonomic Study*. Elsevier.
- Kurtzman, C. P., et C. J. Robnett. 2003. « Phylogenetic Relationships among Yeasts of the "Saccharomyces Complex" Determined from Multigene Sequence Analyses ». *Fems Yeast Research* 3 (4): 417-32. doi:10.1016/S1567-1356(03)00012-6.
- Lindahl, Bjorn D, R Henrik Nilsson, Leho Tedersoo, Kessy Abarenkov, Tor Carlsen, Rasmus Kj  ller, Urmas Koljalg, et al., 2013. « Fungal community analysis by high-throughput sequencing of amplified markers - a user's guide ». *The New Phytologist* 199 (1): 288-99. doi:10.1111/nph.12243.
- Lozupone, C., et R. Knight. 2005. « UniFrac: A New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities ». *Applied and Environmental Microbiology* 71 (12): 8228-35. doi:10.1128/AEM.71.12.8228-8235.2005.
- Marcon, E., et F. Morneau. 2010. « Mesures de la Biodiversité ». [http://www.google.fr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=OCCEQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.ecofog.gf%2FIMG%2Fpdf%2Fmesures\\_de\\_la\\_biodiversite.pdf&ei=JaZpVPzGHNDiaqXEgagD&usg=AFQjCNHGclHqns8R4Bk9LEqbt3QuCTV\\_og&bvm=bv.79142246,d.d2s](http://www.google.fr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=OCCEQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.ecofog.gf%2FIMG%2Fpdf%2Fmesures_de_la_biodiversite.pdf&ei=JaZpVPzGHNDiaqXEgagD&usg=AFQjCNHGclHqns8R4Bk9LEqbt3QuCTV_og&bvm=bv.79142246,d.d2s).
- Martin, Kendall J., et Paul T. Rygielwicz. 2005. « Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts ». *BMC microbiology* 5 (1): 28.
- Nguyen, Huu-Vang, Claude Gaillardin, et Cécile Neuv  glise. 2009. « Differentiation of *Debaryomyces Hansenii* and *Candida Famata* by rRNA Gene Intergenic Spacer Fingerprinting and Reassessment of Phylogenetic Relationships among *D. Hansenii*, *C. Famata*, *D. Fabryi*, *C. Flareri* ( = *D. Subglobosus* ) and *D. Prosopidis* : Description of *D. Vietnamensis* Sp. Nov. Closely Related to *D. Nepalensis* ». *FEMS Yeast Research* 9 (4): 641-62. doi:10.1111/j.1567-1364.2009.00510.x.
- Orgiazzi, Alberto, Valeria Bianciotto, Paola Bonfante, Stefania Daghino, Stefano Ghignone, Alexandra Lazzari, Erica Lumini, et al., 2013. « 454 Pyrosequencing Analysis of Fungal Assemblages from Geographically Distant, Disparate Soils Reveals Spatial Patterning and a Core Mycobiome ». *Diversity* 5 (1): 73-98. doi:10.3390/d5010073.
- Schmieder, Robert, et Robert Edwards. 2011. « Quality Control and Preprocessing of Metagenomic Datasets ». *Bioinformatics* 27 (6): 863-64. doi:10.1093/bioinformatics/btr026.

- Schoch, Conrad L., Keith A. Seifert, Sabine Huhndorf, Vincent Robert, John L. Spouge, C. André Levesque, Wen Chen, *et al.*, 2012. « Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (16): 6241-46.
- Shannon, CE, et W Weaver. 1949. *The Mathematical Theory of Information*. University of Illinois Press.
- Simpson, E. H. 1949. « Measurement of diversity ». *Nature* 163: 688. doi:10.1038/163688a0.
- Taylor, D. L., et T. D. Bruns. 1999. « Community Structure of Ectomycorrhizal Fungi in a Pinus Muricata Forest: Minimal Overlap between the Mature Forest and Resistant Propagule Communities ». *Molecular Ecology* 8 (11): 1837-50. doi:10.1046/j.1365-294x.1999.00773.x.
- Taylor, D. Lee, Michael G. Booth, Jack W. Mcfarland, Ian C. Herriott, Niall J. Lennon, Chad Nusbaum, et Thomas G. Marr. 2008. « Increasing Ecological Inference from High Throughput Sequencing of Fungi in the Environment through a Tagging Approach ». *Molecular Ecology Resources* 8 (4): 742-52. doi:10.1111/j.1755-0998.2008.02094.x.
- Wang, Qiong, George M. Garrity, James M. Tiedje, et James R. Cole. 2007. « Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy ». *Applied and Environmental Microbiology* 73 (16): 5261-67. doi:10.1128/AEM.00062-07.
- White, Thomas J., T. Bruns, SJWT Lee, J. W. Taylor, et others. 1990. « Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics ». *PCR protocols: a guide to methods and applications* 18: 315-22.





## Chapter 2:

# **Sourdough microbial community dynamics: an analysis during French organic bread-making processes**

(Accepted in Food Microbiology; DOI: 10.1016/j.fm.2014.11.014)

Emilie Lhomme<sup>1#</sup>, Charlotte Urien<sup>2#</sup>, Judith Legrand<sup>3</sup>, Xavier Dousset<sup>4</sup>,

Bernard Onno<sup>1\*</sup> and Delphine Sicard<sup>3,5</sup>

# These authors contributed equally to this work.

<sup>1</sup> LUNAM Université Oniris, Laboratoire de Microbiologie Alimentaire et Industrielle, rue de la Géraudière, Nantes Cedex 3, France.

<sup>2</sup> INRA, UMR 0320/UMR 8120 Génétique Végétale, F-91190 Gif-sur-Yvette, France.

<sup>3</sup> Univ Paris-Sud, UMR 0320/UMR 8120 Génétique Végétale, F-91190 Gif-sur-Yvette, France.

<sup>4</sup> LUNAM Université ONIRIS, UMR INRA 1014 Secalim, rue de la Géraudière, BP 88225 Nantes Cedex 3, France.

<sup>5</sup> INRA, UMR 1083 Sciences pour l'œnologie, 34060 Montpellier Cedex 2, France.

Running title: Microbial community dynamics in French sourdoughs

## Résumé

Le levain naturel est couramment utilisé au cours du processus de panification, particulièrement pour la production de pains « biologiques », produits à partir de farine issue de l'Agriculture Biologique. Malgré son rôle dans la flaveur du pain et la levée de la pâte, la dynamique de la communauté microbienne pendant et entre les processus de panification reste peu décrite. Nous avons étudié la dynamique des bactéries lactiques (LAB) et des levures dans des levains traditionnels produits à partir de farine issue de l'Agriculture Biologique de cinq fours français, au cours du processus de panification et entre deux panifications menées à plusieurs mois d'intervalle. Pour cela, nous avons utilisé des techniques de microbiologie classiques moléculaires. Les levains ont été échantillonnés à quatre étapes clés du processus de panification, en double. L'analyse de la densité microbienne de 68 prélèvements de levains et pâtes à pain révèle que les dénombrements, aussi bien des LAB que des levures, varient au cours du processus de panification et entre deux processus de panification. La composition en espèces est moins variable. Six espèces de LAB et neuf espèces de levures ont été identifiées à partir de, respectivement, 520 et 1 675 colonies. L'espèce dominante de LAB, *Lactobacillus sanfranciscensis*, a été identifiée dans tous les levains et au cours de tous les processus de panification. L'espèce dominante de levure varie d'un processus de panification à l'autre dans un seul cas mais diffère entre les fours. Ces espèces dominantes appartiennent majoritairement au genre *Kazachstania*. Cette étude met en évidence les variations de densité des populations aussi bien au cours du processus de panification qu'entre deux processus, ainsi que la stabilité relative des espèces de la communauté microbienne au cours du processus de panification.

**Mots clefs:** bactéries lactiques, levures, *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Kazachstania* sp., *Saccharomyces* sp.

## Highlights

- First description of microbial dynamics during sourdough bread-making process
- Predominance of *Lactobacillus sanfranciscensis* in organic sourdough analyzed
- Higher diversity in yeast species than in lactic acid bacteria species
- High occurrence of *Kazachstania* species

## Abstract

Natural sourdoughs are commonly used in bread-making processes, especially for organic bread. Despite its role in bread flavor and dough rise, the stability of the sourdough microbial community during and between bread-making processes is debated. We investigated the dynamics of lactic acid bacteria (LAB) and yeast communities in traditional organic sourdoughs of five French bakeries during the bread-making process and several months apart using classical and molecular microbiology techniques. Sourdoughs were sampled at four steps of the bread-making process with repetition. The analysis of microbial density over 68 sourdough /dough samples revealed that both LAB and yeast counts changed along the bread-making process and between bread-making runs. The species composition was less variable. A total of six LAB and nine yeast species were identified from 520 and 1,675 isolates, respectively. The dominant LAB species was *Lactobacillus sanfranciscensis*, found for all bakeries and each bread-making run. The dominant yeast species changed only once between bread-making processes but differed between bakeries. They mostly belonged to the *Kazachstania* clade. Overall, this study highlights the change of population density within the bread making process and between bread-making runs and the relative stability of the sourdough species community during bread-making process.

**Keywords:** lactic acid bacteria, yeast, *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Kazachstania* sp., *Saccharomyces* sp.

## 1. Introduction

Sourdough is used as an alternative to baker's yeast to leave bread dough, although some bakeries use both (De Vuyst and Neysens, 2005). In France, the regulations define sourdough as "dough made from wheat or rye (...) with added water and salt (optional), containing a naturally acidifying microbiota made up primarily of lactic bacteria and yeasts" (Article 4 of Decree no. 93-1074 of September 13<sup>th</sup> 1993). In addition, the decree specifies that sourdough bread "has a potential maximum pH of 4.3 and an acetic acid content of at least 900 ppm". Many studies have now demonstrated the nutritional, sensory, texture and shelf-life advantages of using sourdough composed of lactic acid bacteria (LAB) and yeasts (Galle & Arendt, 2013; Gänzle, 2014; Poutanen *et al.*, 2009).

Among LAB, the genera *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, and especially *Lactobacillus*, have frequently been identified (De Vuyst *et al.*, 2009; Hammes *et al.*, 2005; Huys *et al.*, 2013). Among yeasts, the species *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida humilis* are those most commonly found (Iacumin *et al.*, 2009; Minervini *et al.*, 2012a; Vernocchi *et al.*, 2004). Some stable and specific associations between LAB and yeasts, due to particular nutritional, trophic, and metabolic interactions, have been described (Corsetti and Settanni, 2007; De Vuyst and Neysens, 2005; De Vuyst and Vancanneyt, 2007; Gänzle *et al.*, 2007; Gobbetti *et al.*, 2005).

Recently, a number of studies have considered the influence of different factors on the microbial species composition of sourdough. For instance, the microbial community has been found to change according to the wheat species (Minervini *et al.*, 2012a), the cereals used (Vogelmann *et al.*, 2009), the temperature and the back-slopping time (Vrancken *et al.*, 2011a), the location of the propagation (artisan bakery or laboratory) (Minervini *et al.*, 2012b), and technological factors (Vogelmann and Hertel, 2011).

Despite the well-known microbial composition of sourdoughs in Italy (Lattanzi *et al.*, 2013; Minervini *et al.*, 2012a; Minervini *et al.*, 2012b), Belgium (Scheirlinck *et al.*, 2007, 2008), and Germany (Meroth *et al.*, 2003a; Meroth *et al.*, 2003b), few studies have investigated both LAB and yeast sourdough diversity in France (Huys *et al.*, 2013 and references therein). In fact, previous works on French sourdough have considered only LAB diversity (Ferchichi *et al.*, 2007; Robert *et al.*, 2009; Valcheva *et al.*, 2005; Vera *et al.*, 2011).

Furthermore, to our knowledge, no previous study has investigated the dynamics of the microbial community during the bread-making process except for sweet baked products (Venturi *et al.*, 2012). In addition, only few data are available on the long-term stability of sourdough ecosystems in bakeries (Gänzle and Vogel, 2003; Rosenquist and Hansen, 2000; Scheirlinck *et al.*, 2008). The comparison of the microbiota in one conventional and one organic sourdough suggests that the genetic diversity is less stable in the organic sourdough compared to the conventional one

(Rosenquist & Hansen 2000). However, the stability of the microbiota was never investigated further in organic sourdoughs.

The aims of this study were (i) to analyze the stability of LAB and yeast counts in French organic sourdoughs along the bread-making process and between bread-making runs, (ii) to study the relationships between microbial counts and dough biochemical properties, and (iii) to characterize the LAB and yeast species composition throughout the bread-making processes and their long-term stability.

## **2. Materials and methods**

### **2.1 Sourdough and bread collection**

A total of five bakeries located in distinct regions of France were selected (Supplementary material S1), based on their choice to promote biodiversity conservation and to limit their ecological footprint through the use of natural sourdough and organic flour. A semi-structured interview to describe their bread-making practices was carried out among the five bakeries. The ingredients and technological parameters involved are summarized in Supplementary material S1. In all the bakeries, the chief sourdough was obtained by taking a piece of final leavened dough or dough after kneading at each bread-making run. Bakers' practices differed from one bakery to another (Supplementary material S1). Although temperatures were relatively the same in the bakeries, the number of back-sloppings before the final leavened dough step varied between bakeries, from one (in Bakeries 4 and 5) to three back-sloppings (in Bakery 2). Some other specificities might be noticed: a firm sourdough recipe in Bakery 5, a variation of the back-slopping period (short for Bakeries 1 and 2 (about 6h)) and the percentage of sourdough added in final dough (higher for Bakeries 1 and 4 (>30%)).

Samples were taken at four steps during the bread-making process: chief sourdough (CS), final leavened dough (LD), dough after kneading (AK) and bread before baking (BB) (Supplementary material S2). Two independent samples were taken at each bread-making process step except for Bakery 1 and for the first bread-making run sampling for Bakeries 2 and 3. For each bakery, the sampling was repeated during two different bread-making runs, seven to ten months apart (Supplementary material S1). All samples were kept at 4 °C for three to seven hours before analysis. Then, LAB and yeast were enumerated for all collected samples. Finally, LAB and yeast species were identified for all samples of the first collection and for the final leavened dough samples of the second analyzed bread-making run.

## 2.2 LAB and yeast enumeration and isolation

Sourdough samples (10 g) were homogenized by adding 90 ml of sterile tryptone salt (TS) solution [0.85% (wt/vol) NaCl; 0.1% tryptone (wt/vol)] and mixing for 2 min using a Stomacher (AES Laboratories, France). A 10-fold dilution series from  $10^{-2}$  to  $10^{-6}$  was made and plated in triplicate using either a spiral plate method (Easyspiral, Intersciences, Saint Nom, France) or a spreading plate method on MRS5 agar (Meroth *et al.*, 2003b) and on Yeast Extract (YE) media (yeast extract 1%, glucose 2%, agar 1.7%) to determine LAB and yeast counts, respectively. LAB were counted after incubation for 48 h at 30 °C under anaerobic conditions (Anaerocult A, Merck, Darmstadt, Germany). Yeasts were enumerated after incubation for 48 h to 72 h at room temperature under aerobic conditions.

For each sourdough sample, 30 LAB colonies and 40 yeast colonies were randomly picked from the plates and isolated on MRS5 agar and YE agar, respectively. After catalase and Gram tests, a total of 520 Gram-positive and catalase-negative LAB isolates were selected and stored at -80 °C in MRS5 medium containing glycerol (20%). A total of 1,675 yeast isolates were stored at -80 °C in YE medium containing glycerol (17.4%).

The strains used as references for LAB and yeast species identification are listed in Supplementary material S3. The yeast type strains used in this study are preserved at CIRM-Levures (<http://www6.inra.fr/cirm/Levures>).

## 2.3 Determination of pH, titratable acidity and organic acids

Determination of pH, titratable acidity and organic acid content was carried out for each sourdough and dough sample as well as for bread. Ten grams of sourdough, dough or bread were mixed with 90 ml of TS solution in a Stomacher for 2 min. Then, 10 ml of the mixture was homogenized and the pH and total titratable acidity (TTA) were measured with an automatic titrator (pH-Matic 23, Crison). For D- and L-lactic and acetic acid measurements, 10 ml of the homogenized mixture was centrifuged at 7,000 g for 10 min at room temperature and the supernatant was used for measurements using the Enzytec™ Kit as described in the instruction manual, and by measuring absorbance at 340 nm (Genesys 10). Acid amounts were expressed as g/kg of sourdough, dough or bread.

## 2.4 DNA extraction

The direct DNA extractions from sourdough or dough samples (30 g) were performed as described previously (Jaffrès *et al.*, 2009).

The chromosomal DNA of bacterial strains was extracted from the pellet of bacteria grown in 5 ml MRS5. Then, DNA purification was carried out using a Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit, as described in the Qiagen instruction manual (Qiagen, SA, Courtaboeuf, France).

For DNA extraction from yeasts, strains were grown at 30 °C in 1 ml of YE (1% YE, 2% glucose) shaken at 200 rpm. After digestion of the pellet for one hour at 37 °C using 10 units of zymolyase (Euromedex, Souffelweyersheim, France) in 0.5 ml of sorbitol 1 M, Na<sub>2</sub>EDTA 0.1 M, pH 7.5 buffer, a classic method of DNA extraction was used in which the cell membrane was broken with a detergent (SDS), deproteinization was carried out with potassium acetate and finally DNA was purified on a Whatman unifier (Whatman, Florham Park, NJ). For 28 isolates coming from Bakery 2, DNA glass bead extraction was adapted from Burke *et al.* (2000).

## 2.5. LAB species identification

LAB isolates were identified by partial or whole 16S rDNA sequencing, PCR targeting some specific genes, or by TTGE.

The 16S rDNA (about 1,500 bp) of the pure LAB isolates was amplified by PCR as described previously (Jaffrès *et al.*, 2009) from chromosomal DNA using primers fD1 and rD1 (Supplementary material S4), which anneal to positions 8 to 27 and to positions 1524 to 1541 respectively, of the 16S rRNA gene, *E. coli* numbering (GenBank accession number J01695) (Weisburg *et al.*, 1991).

The sequencing primer SP1 (position 338 forward), SP2 (position 514 reverse), SP3 (position 810 forward), and SP5 (position 1089 reverse) targeted to conserved regions of the 16S rRNA gene, *E. coli* (GenBank J01695) (Supplementary material S4). Partial nucleotide sequence (about 700 bp) of the amplified 16S rDNA gene was determined using the sequencing primer SP1. The whole 16S rDNA gene was sequenced (about 1,500 bp) using sequencing primers SP. DNA sequences were determined using the Beckman Coulter Genomics service, (Takeley, UK). The overlapping double strand sequences obtained with SP1 and SP2 or with SP3 and SP5 were merged using the BioEdit program. Identification queries were fulfilled by a BLAST search in the National Center for Biotechnology Information database (NCBI, Bethesda, USA). A similarity of at least 97.6% to 16S rDNA gene sequences of type strains was used as the criterion for identification (Stackebrandt and Ebers, 2006). As the 16S rDNA sequence did not allow discriminating *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum* and *Lactobacillus pentosus*, a multiplex PCR targeting the *recA* gene (Supplementary material S4), as described by Torriani *et al.* (2001), was performed. In addition, a PCR targeting the *katA* gene (407 bp) was used (Supplementary material S4), as described by Ammor *et al.* (2005), to confirm the 16S rDNA identification of *Lactobacillus sakei* species which is heme-dependent catalase (Chaillou *et al.*, 2005). In the same way, a PCR targeting the 16S – 23S rDNA intergenic spacer region was used (Supplementary material S4), as described by Ferchichi *et al.* (2008), to confirm the 16S rDNA identification of *Lactobacillus hammesii* species. All PCR amplifications were checked by electrophoresis and visualized by DNA gel staining (SYBR Safe, Invitrogen, Villebon-sur-Yvette, France).



For PCR-TTGE, primers V3P2 and V3P3-GC-Clamp (Supplementary material S4) were used to amplify the V3 region ( $\approx 200$  bp) of 16S rDNA as previously described (Jaffrès *et al.*, 2009). Amplicons were visualized on a 1.5% agarose gel by staining with SYBR Safe. The PCR products were subjected to a TTGE analysis, as described previously (Jaffrès *et al.*, 2009). After the run, gels were stained for 30 min in 300 ml of SYBR Safe 1 X then rinsed in Milli-Q water and visualized by UV illumination.

## 2.6 Yeast species identification

Yeast species were identified on the basis of three molecular markers: the *AluI* digestion profile of the amplified rDNA Non-Transcribed Spacer, *NTS2* (Nguyen and Gaillardin, 1997), the sequence of the rDNA D1/D2 region (Kurtzman and Robnett, 2003), and the sequence of the actin encoding gene, *ACT1* (Daniel and Meyer, 2003; Kan, 1993). All the oligonucleotide PCR primers used were obtained from Invitrogen (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and are listed in Supplementary material S4.

Species of all yeast isolates were characterized on the basis of their pattern of *AluI* digestion of the amplified *NTS2* region. For each sample, PCR was carried out according to Nguyen *et al.* (2009) using primers LR13 and SR21 and home-made Taq polymerase. Then, 5  $\mu$ l of PCR product was digested using 2.5 units of *AluI* restriction enzyme (New England Biolabs, Ipswich, England) for 1 h at 37 °C using the manufacturer's recommended procedure. Digestion profiles were visualized on a 1.2% agarose gel. For each bakery and each bread-making run, from one to three representatives of each *NTS2-AluI* digestion profile were selected for further characterization of the species by D1/D2 and *ACT1* sequencing leading to a total of 55 isolates.

Species identification was extended by sequencing the D1/D2 rDNA region (Kurtzman and Robnett, 2003). PCR amplifications were run in 50  $\mu$ l containing 2 mM of each dNTP, 0.5  $\mu$ M of each primer NL1 and NL4 (O'Donnell, 1993), 2 mM of  $MgCl_2$ , 1.25 units of GoTaq DNA polymerase (Promega, Madison, USA), 1 X Taq PCR buffer [80 mM Tris-HCl [pH 8.8], 0.05% (v/v)] Tween-20, 335 mM  $[(NH_4)_2SO_4]$  and 25 to 125 ng of template DNA from pure cells. After an initial denaturation at 94 °C for 4 min, 30 cycles of amplification were conducted as follows: denaturation at 94 °C for 30 sec, annealing at 54 °C for 40 sec, and extension at 72 °C for 1 min and 30 sec. Amplicons were visualized on a 0.8% agarose gel. Finally, 20  $\mu$ l of PCR products were sent for sequencing of both strands (Genoscreen, Lille, France).

Species identification was completed for 55 strains by sequencing *ACT1* gene (Daniel and Meyer, 2003; Kan, 1993). PCR amplifications were run in 25  $\mu$ l containing 0.2 mM of each dNTP, 0.2  $\mu$ M of each primer CA14 and CA5R (Kan, 1993), 1 unit of Takara Ex Taq DNA polymerase (Takara Bio Inc., Shiga, Japan), 1 X Ex Taq Takara buffer and 25 ng of template DNA from pure cells. After an initial denaturation at 95 °C for 3 min, 30 cycles of amplification were conducted as follows: denaturation at 95 °C for 30 sec, annealing at 54 °C for 40 sec, and extension at 72 °C for 1 min. The final extension

was at 72 °C for 7 min. PCR products were Sanger sequenced on both strands (Genoscreen, Lille, France). Amplicons were visualized on a 0.8% agarose gel.

DNA sequence alignments were carried out as described above. Identification queries were fulfilled by a BLAST search in the NCBI (see above) and the YeastIP databases (<http://genome.jouy.inra.fr/yeastip/>). A similarity of more than 99% to gene sequences of type strains was used as the criterion for identification.

## 2.7 Microbial count analysis

We tested whether LAB and yeast counts varied according to the following co-factors: bakeries, bread-making steps of the process, bread-making runs, and within the dough. Because the samples from three bakeries were plated with the spiral plate method while those from the other two bakeries were plated with the spreading plate method, the bakery effect and the enumeration method (plating or spiral) effect were partly mixed up. Hence, to avoid an overestimation of the bakery effect, the plating method was accounted for in the model.

In order to test the effect of various co-factors on the variations in LAB and yeast counts, a linear mixed effect model was built as described below:

$$Y_{ijklmn} = \mu + \alpha_i + \beta_j + B_k + D_{l(k)} + R_{m(jkl)} + \varepsilon_{ijklmn}$$

where  $Y_{ijklmn}$  is the log-transformed LAB (yeast, respectively) count  $n$  ( $n = 1; 3$ ) of the dough sample  $m$  ( $m = 1; 2$ ) carried out at the process step  $j$  ( $j = 1; 4$ ) during the bread-making run  $l$  ( $l = 1; 2$ ) in the bakery  $k$  ( $k = 1; 5$ ) measured by the colony plating method  $i$  ( $i = 1; 2$ ). The colony plating method and the process step were modeled as fixed effects ( $\alpha_i$  and  $\beta_j$ , respectively). The bakery, the bread-making run and the dough replicate were modeled as Gaussian random effects ( $B_k$ ,  $D_{l(k)}$  and  $R_{m(jkl)}$ , respectively) with variance denoted by  $\sigma_B^2$ ,  $\sigma_D^2$  and  $\sigma_R^2$ , respectively. The residuals  $\varepsilon_{ijklmn}$  were assumed independent and identically distributed according to a normal distribution  $N(\mu, \sigma^2)$ .

Fixed and random effects were tested using likelihood-ratio tests with a 5% significance level. For random effect tests, p-values were estimated by simulating the likelihood-ratio under the null hypothesis. To compare the means of counts at the different process steps, Tukey tests were performed. REML algorithms were used for estimates while ML algorithms were used for tests. Statistical analyses were performed with the nlme and multcomp R packages (<http://www.r-project.org/>).

## **2.8 Species diversity analysis**

The species diversity was estimated using the observed richness and three  $\alpha$  diversity indexes (Marcon and Morneau, 2010), which measure the local diversity in a delimited system: the Shannon index (Shannon and Weaver, 1949), which takes into account the number of species and their frequency, the Simpson index (Simpson, 1949), which characterizes the probability of two randomly chosen individuals belonging to different species in a community, and the Chao1 richness (Chao, 1984), which takes into account the rarefaction of species.

## **2.9 Multivariate analysis of microorganism counts and dough biochemical properties**

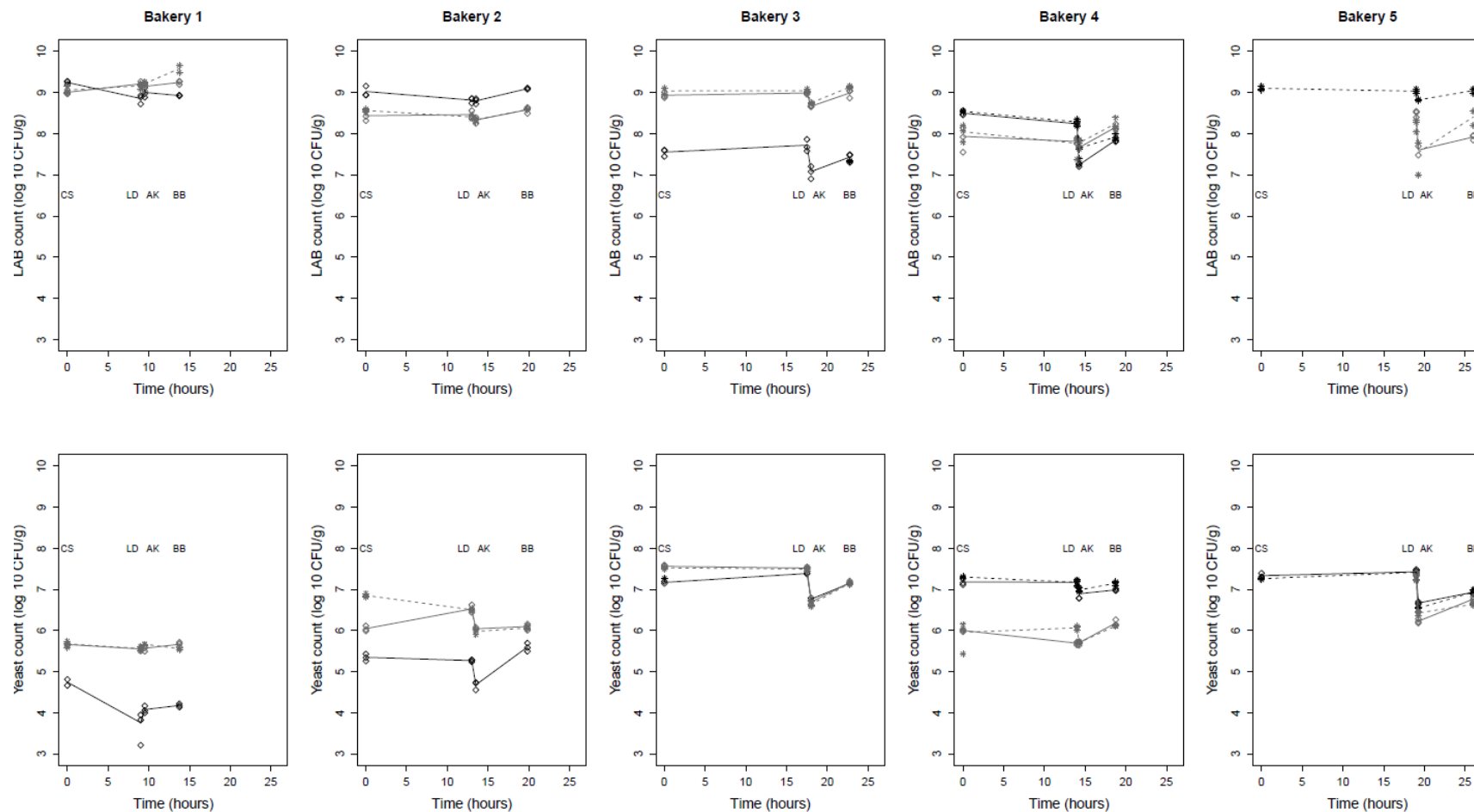
A Principal Component Analysis (PCA) was performed in order to highlight the relationships between microorganism counts and biochemical properties of dough. All biochemical variables (pH, lactic acid and acetic acid contents and TTA), yeast and LAB average counts and the LAB:yeast ratio for each dough replicate were analyzed (Supplementary material S5). We tested whether pH and TTA were related to the average LAB (or yeast) count within a bread-making run using simple linear models including the bread making-run and the counts as co-factors.

## **3. Results**

### **3.1. Dynamics of LAB and yeast counts**

Over all the dough samples, the LAB count varied from 7 to 9.7  $\log_{10}$  CFU/g (Figure 1). The bakery effect on the LAB count was not significant (p-value ( $P$ ) = 0.33, Supplementary material S6). By contrast, the LAB counts depended on the bread-making process steps ( $P < 10^{-4}$ , Supplementary material S6, and Figure 1). In fact, on average, the LAB count was lower in the dough after kneading than in the other time points ( $P < 10^{-3}$ ). Variations in LAB counts were also explained by significant variations between bread-making runs (Standard Deviation (SD) = 0.59, CI 95% = [0.31; 1.11]) and, to a lesser extent, between dough replicates (SD = 0.20, CI 95% [0.16; 0.25]).

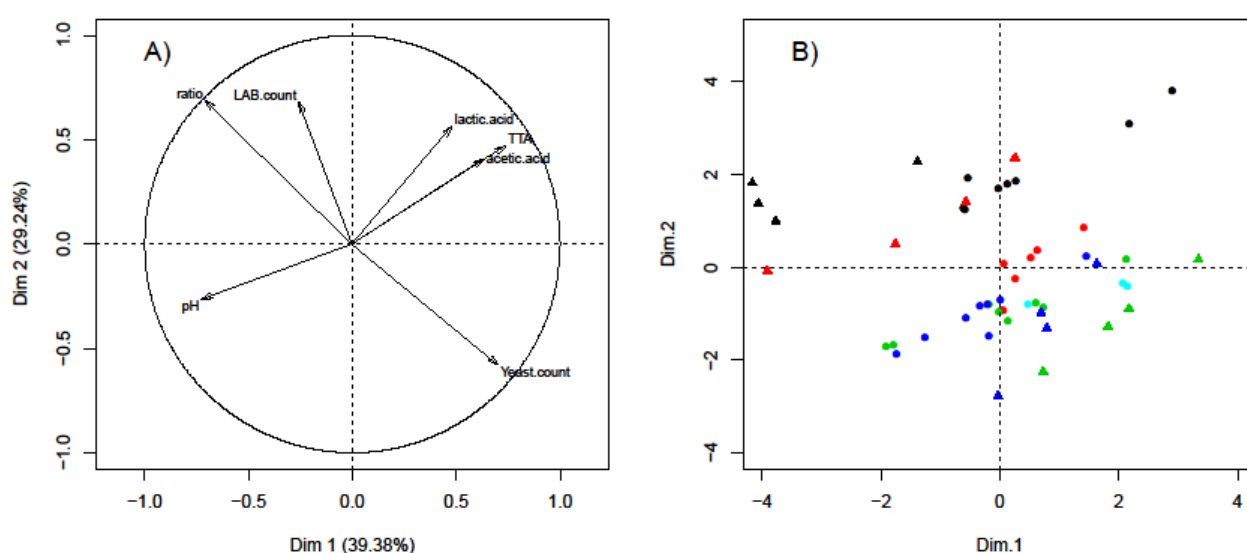
Over all the samples, the yeast count ranged from 3.2 to 7.6  $\log_{10}$  CFU/g (Figure 1). As for LAB, the bakery effect was not significant ( $P$  = 0.21, Supplementary material S6) but the yeast count varied significantly during the bread-making process ( $P < 10^{-4}$ , Supplementary material S6). In fact, the yeast count was lower in the dough after kneading than in the other time points ( $P < 10^{-3}$ ). Variations in yeast counts were also explained by significant variations between bread-making runs (SD = 0.68, CI 95% = [0.36; 1.27]) and, to a lesser extent, between dough replicates (SD = 0.22, CI 95% = [0.18; 0.27]).



**Figure 1:** LAB and yeast  $\log_{10}$  counts during bread-making processes of the 5 bakeries as a function of time in hours (time) since the first sampling step. CS = chief sourdough; LD = final leavened dough; AK = bread dough after kneading; BB = bread before baking; \* = dough replicate 1; ◇ = dough replicate 2; black = first bread-making run; gray = second bread-making run.

### 3.2 Relationships between microorganism counts and biochemical parameters

Relationship between biochemical parameters of sourdoughs and communities of microorganisms were analyzed by PCA (Figure 3). The first two axes of the PCA explained 69% of the total variance (39.31% and 29.42%, respectively, Figure 3A). TTA, pH, LAB:yeast ratio and yeast count mainly contributed to the first axis. This axis separated samples from different bread-making runs in the same bakery (symbols, Figure 3B). Three main variables explained the second axis: LAB:yeast ratio, LAB and yeast counts. This axis separated samples from different bakeries (different colors, Figure 3B). The samples carrying the least common yeast and LAB species, *T. delbrueckii* (Bakery 1, first run, Table 1) and *L. plantarum* (Bakery 3, first run, Table 1), respectively, were separated on the PCA map. As seen previously with the statistical model, microbial density differed between bread-making runs. Within a bread-making run, pH and TTA varied over time (Figure 3B and Supplementary material S7). For some bread-making runs, pH and TTA decreased linearly with LAB or yeast count (Supplementary material S8). During bread-making process, positive correlations between LAB and yeast counts were observed, reflecting the growth of the microbial population during the bread-making process due to the addition of resources (Figure 3B and Supplementary material S9).



**Figure 3:** Principal Component Analysis. A): Variables factor map on 1 and 2 axes; B): Individuals factor map on 1 and 2 axis. ratio = LAB:yeast ratio; black = Bakery 1; red = Bakery 2; green = Bakery 3; blue = Bakery 4; turquoise = Bakery 5; Δ = first bread-making run; o = second bread-making run.

	<i>L. sanfranciscensis</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. sakei</i>	<i>L. pentosus</i>	<i>L. kimchii</i>	<i>L. hammessii</i>	<i>T. delbrueckii</i>	<i>C. carpophila</i>	<i>H. pseudoburtonii</i>	<i>K. unisporea</i>	<i>K. bulderi</i>	<i>C. humilis</i>	<i>Rhodotorula sp.</i>	<i>K. exigua</i>	<i>S. cerevisiae</i>
B1_BMR1_CS	25						40								
B1_BMR1_LD	24						35	4	1						
B1_BMR1_AK	23						38		1						
B1_BMR1_BB	15						39								
B1_BMR2_LD	22													79	1
B2_BMR1_CS	17									40					
B2_BMR1_LD	22									39					
B2_BMR1_AK	25									40					
B2_BMR1_BB	22									12			28		
B2_BMR2_LD	36									60				20	
B3_BMR1_CS		7									80				
B3_BMR1_LD		17									80				
B3_BMR1_AK	3	13									80				
B3_BMR1_BB		18									80				
B3_BMR2_LD	11	5									80				
B4_BMR1_CS	13	2									80				
B4_BMR1_LD	19	1									80				
B4_BMR1_AK	2	2				1					80				
B4_BMR1_BB	7										80				
B4_BMR2_LD	12		14								80				
B5_BMR1_CS	29				4	2							79		
B5_BMR1_LD	25	1											80		
B5_BMR1_AK	29												79		
B5_BMR1_BB	20												80		
B5_BMR2_LD	10			2	11	9							79		1
Total isolates	411	66	14	2	15	12	152	4	2	191	800	397	28	99	2
Percentage (%) of LAB and yeasts isolates	79.0	12.8	2.7	0.4	2.8	2.3	9.1	0.2	0.1	11.4	47.8	23.7	1.7	5.9	0.1

**Table 1:** Number of yeasts and LAB isolates for each bakery (B) from the two bread-making runs (BMR1 and BMR2) according to the process step (CS: chief sourdough; LSD: final leavened dough; AK: after kneading; BB: before baking).The genus names were abbreviated as L: *Lactobacillus*; C: *Candida*; T: *Torulospora*; H: *Hyphopichia*; K: *Kazachstania*; S: *Saccharomyces*

### 3.3 Species diversity of LAB

#### 3.3.1 LAB species diversity

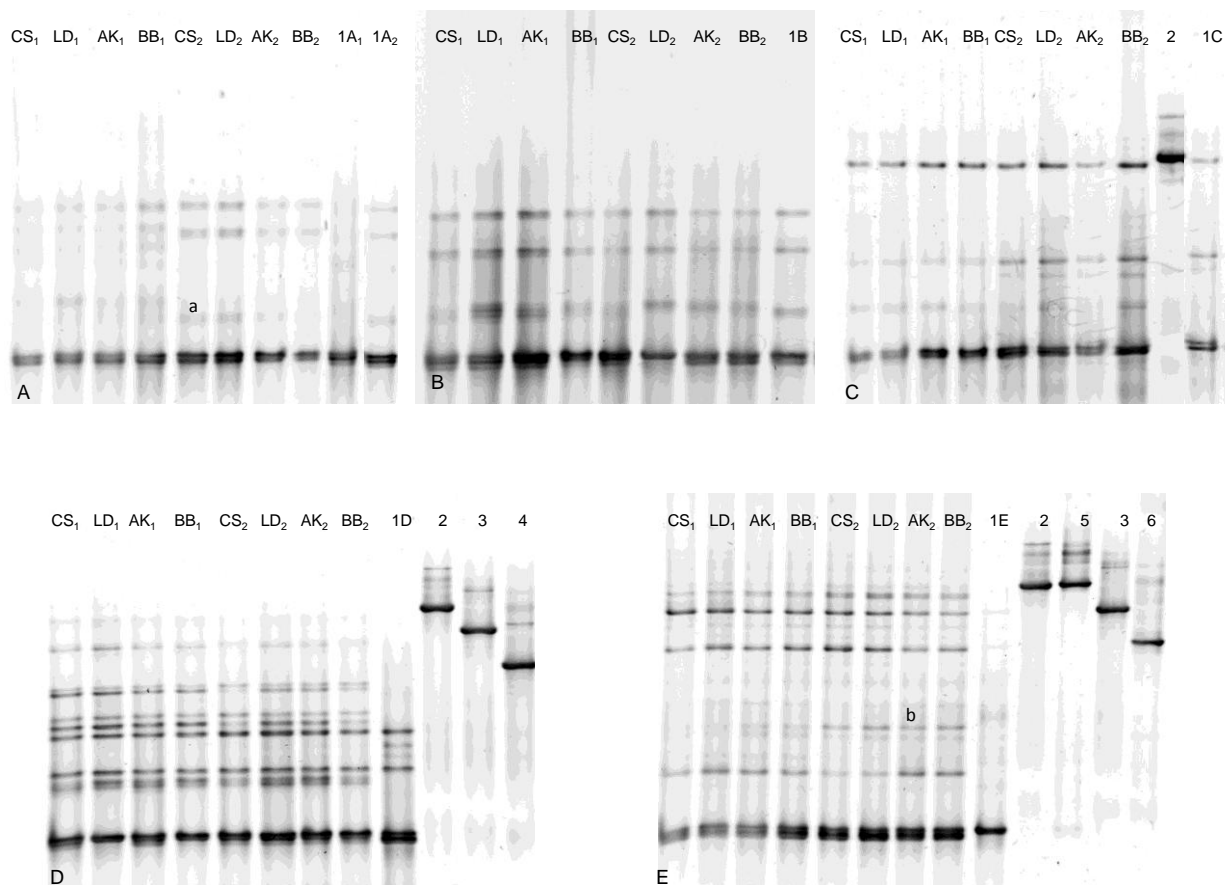
The sequencing of 16S rRNA gene of 520 isolates allowed identifying six different species (Table 1). The main one was *Lactobacillus sanfranciscensis* (79%) followed by *L. plantarum* (12.8%). *Lactobacillus kimchii* (2.8%), *L. sakei* (2.7%), *L. hammesii* (2.3%) and *Lactobacillus pentosus* (0.4%) were also found as minor species (Table 1).

While *L. sanfranciscensis* remained the only species identified for Bakeries 1 and 2 in the two bread-making runs, changes between runs were observed for Bakeries 3, 4 and 5. For example, for Bakery 3, *L. plantarum* was the dominant species during the first run, while the dominance was shared with *L. sanfranciscensis* in the second run. For Bakery 4, *L. sanfranciscensis* was the predominant species for the two runs but the minor species changed. *L. plantarum* and *L. hammesii*, which were detected as minor species during the first run, were no longer detected in the second run but *L. sakei* was found instead. Finally, for Bakery 5, *L. sanfranciscensis* was detected as the predominant species during the first run while in the second one, *L. sanfranciscensis*, *L. hammesii* and *L. kimchii* were co-dominant, and *L. pentosus* was found as a minor species (Table 1).

#### 3.3.2 Bacterial community dynamics analyzed by PCR-TTGE

In order to examine the bacterial population dynamics throughout the bread-making run, fingerprints of the DNA samples of sourdoughs and doughs of each step of the two bread-making runs were analyzed by PCR-TTGE. One isolate of each species, identified by 16S rDNA sequencing, was used as the control (Figure 2).

Each bakery harbored a specific profile and this profile appeared to be clearly stable during the process. For Bakeries 2, 3, and 4 the PCR-TTGE profiles were identical at the two sampling periods, and comparable to those of the *L. sanfranciscensis* strains isolated from the corresponding sourdoughs (Figure 2B, 2C, 2D). However, for Bakeries 1 and 5, an additional band was observed (band a, Figure 2A and band b, Figure 2E, respectively) suggesting an evolution of the bacterial community between the two sampling periods. In addition, for all the bakeries, the profiles of *L. sanfranciscensis* strains were different suggesting a large intraspecific diversity.



**Figure 2:** PCR-TTGE profiles during the two bread-making processes.

PCR-TTGE profiles were obtained with primers V3P2 and V3P3.

CS: chief sourdough; LD: final leavened sourdough; AK: dough after kneading; BB: bread before baking. <sub>1</sub> and <sub>2</sub> indicate the first or second sampling of the bread-making run.

Control strains: 1: *L. sanfranciscensis* isolated from sourdough studied; 2: *L. plantarum* ATCC 14917; 3: *L. hammesii* CIP 108387; 4: *L. sakei* ATCC 15521; 5: *L. pentosus* ATCC 8041; 6: *L. kimchii* DSM 13961

A: Bakery 1; B: Bakery 2; C: Bakery 3; D: Bakery 4; E: Bakery 5

a and b show the band present in only one of the bread-making runs for Bakeries 1 and 5, respectively.



### 3.4 Yeast species diversity

The *AluI* digestions of the *NTS2* region were amplified from the 1,675 yeast strains and 9 yeast species were identified corresponding to nine *AluI* digestion patterns (Table 1). Among the whole sample, 48% of the identified yeast species belonged to *Kazachstania bulderi*, 24% was represented by *C. humilis* and the other species were *Kazachstania unispora* (11.4%), *Torulaspora delbrueckii* (9.1%), *Kazachstania exigua* (5.9%), *Rhodotorula mucilaginosa* (1.7%), *Candida carpophila* (0.2%), *S. cerevisiae* (0.1%) and *Hyphopichia pseudoburtonii* (0.1%). One of these species, *Kazachstania bulderi*, has never been isolated in bakery products before. No yeast species was shared by all bakeries (Table 1).

The dominant yeast species appeared to be stable during bread-making process and between runs within the same bakery. The only exceptions were Bakery 2, where a change in the dominant species appeared at the end of one of the bread-making process, and Bakery 1, where the dominant species changed between runs. Only two (from Bakeries 1 and 5) out of 1,675 isolates belonged to the *S. cerevisiae* species, usually used as a leavening agent in bakery products.

### 3.5 Species diversity indexes

The number of yeast and LAB species (observed richness) varied from one to five per bakery. Except for Bakery 1 for yeasts and Bakery 5 for LAB, where the Chao1 richness was estimated at 5.5 and thus exceeded the 5 observed species indicating we may have missed species, our sampling appears to give a good representation of the species diversity (Table 2). Over all the  $\alpha$ -diversity indexes, a larger diversity was described within a bakery than between bakeries for LAB (Simpson index = 0 to 0.44 versus 0.36, Shannon index = 0 to 0.80 versus 0.76). By contrast, more diversity was observed between bakeries than within a bakery for yeasts (Simpson index = 0.69 versus 0 to 0.48; Shannon index = 1.43 versus 0 to 0.78). It appears that a high LAB diversity index is associated to a low yeast diversity index and conversely (Table 2). A low LAB diversity index corresponded to *L. sanfranciscensis* alone associated to different yeast species and high LAB diversity index characterized a microbiota where one dominant yeast species was associated to several LAB species (Table 2).

	Observed richness		Chao1 richness		Shannon diversity		Simpson diversity	
	Yeast	LAB	Yeast	LAB	Yeast	LAB	Yeast	LAB
Bakery 1	5	1	5.5	1	0.78	0	0.48	0
Bakery 2	3	1	3	1	0.64	0	0.34	0
Bakery 3	1	2	1	2	0	0.49	0	0.31
Bakery 4	1	4	1	4	0	0.80	0	0.44
Bakery 5	2	5	2	5.5	0.02	0.71	0.01	0.35
Total	9	6	9	6	1.43	0.76	0.69	0.36

**Table 2:**  $\alpha$  diversity indexes of the LAB and yeast communities

#### 4. Discussion

The LAB and yeast counts varied extensively from 7 log<sub>10</sub> to 9.7 log<sub>10</sub> CFU/g and 3.2 log<sub>10</sub> to 7.6 log<sub>10</sub> CFU/g of dough, respectively and the LAB:yeast ratio ranged from 1:1 to 10,000:1 as previously found in sourdoughs (Lattanzi *et al.*, 2013; Minervini *et al.*, 2012a; Scheirlink *et al.*, 2007; Vrancken *et al.*, 2010). The LAB and yeast counts changed significantly between bread-making runs. This could not be easily explained by the bread-making practice as practices did not change between runs except for Bakery 3, where rye and wheat flour were used for the first bread-making run and only wheat flour for the second run. Thus, the origin of the flour may make a difference although the number of LAB in rye sourdough is assumed to be similar to that in wheat sourdough (Ercolini, 2013; Ercolini *et al.*, 2013; Weckx *et al.*, 2010). Alternatively, external factors such as temperature fluctuation could change microbial counts between bread-making runs (Kurtzman and Robnett, 2003; Meroth *et al.*, 2003a; Vogelmann and Hertel, 2011; Vrancken, *et al.*, 2011b). Finally, the microbial composition of the community may affect the microbial counts, as suggested by the low counts of yeasts in presence of *T. delbrueckii* observed for Bakery 1 and also in a Belgium sourdough (Scheirlink *et al.*, 2007). The consequences of a low count are not well documented, but may not be a low leavening ability (Reale *et al.*, 2013).

We also found count variations during the bread-making process but this variation was ten times lower than between bread-making runs. For both LAB and yeasts, the counts after kneading decreased significantly compared to the other steps, as expected after the addition of flour and water during kneading. In addition, we found significant count variation between replicates of the same dough. Despite sourdough mixing, this result suggests that sourdough is not completely

homogeneous. However, unlike for cheese (Ercolini *et al.*, 2003), we found that sample position in the dough affected the microbial count but not the microbial species diversity.

The analysis of biochemical properties did not allow for detecting main factors influencing dough properties. The acidity of the dough did not seem to be determined by microbial count alone; it increased with microbial count during only some bread-making runs. Acidity variation is probably a complex interplay between the addition of flour, which increases pH and decreases TTA, and the fermentation process, which acidifies the dough due to the microorganisms throughout fermentative metabolism without significant growth. Complementary phenotypic descriptions of the LAB and yeast isolated in the sampling are required to better understand the relationship between these two types of organism.

The LAB species *L. sanfranciscensis* unquestionably dominated the sourdough ecosystem. In previous studies of French sourdoughs, *L. sanfranciscensis* was either not found (Valcheva *et al.*, 2006; Vera *et al.*, 2011) or detected but not predominantly (Ferchichi *et al.*, 2007; Robert *et al.*, 2009; Valcheva *et al.*, 2005). Yet, with the exception of reports by Groenewald *et al.* (2006), *L. sanfranciscensis* has only been isolated from sourdough and is known to be dominant (Lattanzi *et al.*, 2013; Minervini *et al.*, 2012a; Scheirlinck *et al.*, 2008). Moreover, the analysis of the sequenced *L. sanfranciscensis* TMW 1.1304 strain has shown that its metabolism is specifically adapted to the sourdough environment. Hence, the genome of *L. sanfranciscensis* enables it to grow easily in this environment and contributes to its ability to out-compete other bacteria in traditional sourdough (Vogel *et al.*, 2011). Unlike *L. sanfranciscensis*, the other LAB species detected in this study, *L. pentosus*, *L. sakei*, *L. plantarum* and *L. kimchii*, have already been detected in sourdough and are also frequently isolated from other habitats (Botta and Coccolin, 2012; Chaillou *et al.*, 2013; Corsetti and Gobbetti, 2002; Yoon *et al.*, 2000).

Compared to other extensive sourdoughs studies in Italy and Belgium (Lattanzi *et al.* 2013; Minervini *et al.* 2012a; Minervini *et al.* 2012b; Vrancken *et al.* 2010), we found a high diversity for yeast species whereas only five bakeries were sampled. There was nine yeast species over all five bakeries. Five species belonged to the *Saccharomycotina* subphylum and among them most were in the *Kazachstania* clade: *K. unispora*, *K. exigua*, *K. bulderi* and *C. humilis* (Kurtzman and Robnett, 2003). All the dominant yeast species, except *K. bulderi*, have already been described in bakery products (Minervini, *et al.*, 2012a; Nuobariene *et al.*, 2012; Palomba *et al.*, 2010; Valmorri *et al.*, 2010; Vrancken *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011). Among 69 natural sourdoughs previously analyzed in Italy, Belgium, Denmark and China, more than 90% contained *S. cerevisiae*, 23% *C. humilis* and 3% *K. unispora* (Gullo *et al.*, 2003; Minervini, 2012a; Nuobariene *et al.*, 2012; Palomba *et al.*, 2010; Scheirlinck *et al.*, 2007; Valmorri *et al.*, 2010; Vrancken *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011). In contrast with the literature, *S. cerevisiae* and *C. humilis* were not the most common species in our sampling

(for a review, see De Vuyst *et al.* (2014)). In fact, despite the use of baker's yeast for another type of bread product in Bakery 5, *S. cerevisiae* was only identified once in 398 isolates. This might be contamination from baker's yeast (Minervini *et al.*, 2012a; Venturi *et al.*, 2012; Vrancken *et al.*, 2010) or an introduction from the flour (Meroth *et al.*, 2004). Our results suggest that *S. cerevisiae* does not compete with other sourdough and bread dough yeast species and that *Kazachstania* species may be as well or better adapted to these environments.

The species *K. bulderi*, which we found for the first time in bread dough, has been isolated in a 3-month-old maize silage (Middelhoven *et al.*, 2000) and in liquid food used to feed piglets (Gori *et al.*, 2011). The recent description of this species, as well as its genetic proximity with *Kazachstania barnettii* (Middelhoven *et al.*, 2000), could explain why it has never been previously identified in sourdough. Surprisingly, we also found that *R. mucilaginosa* could become the dominant identified yeast species at the last step of the bread-making process. The invasion of *R. mucilaginosa* might be related to the textile covering the bread at the end of the bread-making process and could play a role in the final bread taste and flavor, though not in the bread rise (Zhang *et al.*, 2011). Overall, we found that organic French sourdoughs harbor special yeast communities in which *K. bulderi* (48% of the isolates) and *C. humilis* (24%) are common and *S. cerevisiae* (less than 0.2%) is rare. Whether this high yeast species diversity is related to organic flour acting as a reservoir or is related to the sampled bakeries, which are on farm or closely related to farmers (except for Bakery 5), should be investigated.

The dominant yeast and LAB species appeared to be stable during bread-making process. The dominant yeast and LAB species were also stable over bread-making runs except in one case, where the yeast species *T. delbrueckii* was replaced by *K. exigua*. This confirmed previous findings by Venturi *et al.* (2012) and Rosenquist and Hansen (2000). The LAB PCR-TTGE fingerprints did not fully agree with the data obtained using the culture-dependent approach. This discord was expected because PCR-TTGE analyzes the total DNA of a matrix (Ercolini, 2004) and thus does not distinguish between viable and non-viable microorganisms. On the other hand, when bacteria are isolated by plating but not detected with PCR-TTGE, it seems they are not a major component of the microbial community being investigated (Alfonzo *et al.*, 2013). However, overall, the profiles were identical even in the case of Bakery 3, which switched from rye/wheat flour to wheat flour. These results are consistent with previous data (Gänzle, 2014; Minervini *et al.*, 2012b; Scheirlinck *et al.*, 2008; Weckx *et al.*, 2010) showing that the LAB diversity is mainly influenced by the bakery environment, bakery practices and back-slopping parameters rather than by the flour used.

The stable presence of *L. sanfranciscensis* in the different bakeries suggests a high fitness of this species in natural sourdoughs as previously reported by other authors (Meroth *et al.*, 2003; Siragusa *et al.*, 2009; Venturi *et al.*, 2012; Vrancken *et al.*, 2011a). The stable presence of *K. unispora* and *K.*

*bulderi* was never reported before and suggests that these species are fit in natural sourdoughs. By contrast, the low yeast count of *T. delbruecki*, and *L. plantarum* as well as the fact that they have been replaced over time completely or partly, respectively by *K. exigua* and *L. sanfranciscensis* may reflect a low competitiveness of *T. delbruecki* and *L. plantarum* compared to *K. exigua* and *L. sanfranciscensis*.

To conclude, this study is the first to highlight the overall stability of the microbial species composition during the bread-making process and to show a significant variation in microbial counts during and between bread-making runs. Our results reveal the predominance of *L. sanfranciscensis* and the dominance of *Kazachstania* species in organic sourdoughs of five French bakeries and suggest that *S. cerevisiae* is not a good competitor in natural organic sourdough. It will be interesting to study the intraspecific diversity and functional potential of different strains of *L. sanfranciscensis* and *Kazachstania* species. Further investigations should also be carried out to test whether organic sourdoughs are a reservoir of microbial diversity.

### **Aknowledgements**

This work was supported by grants from Région Ile-de-France, Oniris and ANR Bakery. We wish to thank Jean-François Berthelot, Christian Dalmasso, Michel Perrin, and the bakers from “Pain Virgule” and “La Boulangeoise” who shared with us their bread making knowledge and pleasure of good bread. We also thank Serge Casaregola, Christelle Louis-Mondésir and Huu-Vang Nguyen for providing strains and for their kind assistance. Many thanks to Sylvie and Isabelle from Oniris for their technical assistance. We are grateful to Professor Hervé Prévost for providing us the internal sequences of the 16S rDNA primers for the lactic acid bacteria isolates identification.

## References

- Alfonzo, A., Ventimiglia, G., Corona, O., Di Gerlando, R., Gaglio, R., Francesca, N., Moschetti, G., Settanni, L., 2013. Diversity and technological potential of lactic acid bacteria of wheat flours. *Food Microbiology* 36, 343-354.
- Ammor, S., Dufour, E., Zagorec, M., Chaillou, S., Chevallier, I., 2005. Characterization and selection of *Lactobacillus sakei* strains isolated from traditional dry sausage for their potential use as starter cultures. *Food Microbiology* 22, 529-538.
- Botta, C., Cocolin, L., 2012. Microbial dynamics and biodiversity of table olives fermentations: the different culture-dependent and -independent approaches. *Frontiers in Microbiology* 3, 245.
- Burke, D., Dawson, D.S., Stearns, T., 2000. *Methods in yeast genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory course manual*, Burke, D, New York, 2000 ed.
- Chaillou, S., Champomier-Verges, M.-C., Cornet, M., Crutz-Le Coq, A.-M., Dudez, A.-M., Martin, V., Beauvils, S., Darbon-Rongere, E., Bossy, R., Loux, V., Zagorec, M., 2005. The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K. *Nat Biotech* 23, 1527-1533.
- Chaillou, S., Lucquin, I., Najjari, A., Zagorec, M., Champomier-Verges, M.C., 2013. Population genetics of *Lactobacillus sakei* reveals three lineages with distinct evolutionary histories. *PLoS ONE* 8, e73253.
- Chao, A., 1984. Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of statistics*, 265-270.
- Corsetti, A., Gobbetti, M., 2002. *Lactobacillus plantarum*, in: Roginski, H. (Ed.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Elsevier, Oxford, pp. 1501-1507.
- Corsetti, A., Settanni, L., 2007. *Lactobacilli* in sourdough fermentation. *Food Research International* 40, 539-558.
- Daniel, H.M., Meyer, W., 2003. Evaluation of ribosomal RNA and actin gene sequences for the identification of ascomycetous yeasts. *International Journal of Food Microbiology* 86, 61-78.
- De Vuyst, L., Neysens, P., 2005. The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends in Food Science & Technology* 16, 43-56.
- De Vuyst, L., Van Kerrebroeck, S., Harth, H., Huys, G., Daniel, H.M., Weckx, S., 2014. Microbial ecology of sourdough fermentations: Diverse or uniform? *Food Microbiology* 37, 11-29.
- De Vuyst, L., Vancanneyt, M., 2007. Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria. *Food Microbiology* 24, 120-127.
- De Vuyst, L., Vrancken, G., Ravyts, F., Rimaux, T., Weckx, S., 2009. Biodiversity, ecological determinants, and metabolic exploitation of sourdough microbiota. *Food Microbiology* 26, 666-675.
- Ercolini, D., Hill, P.J., Dodd, C.E.R., 2003. Bacterial community structure and location in Stilton cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 3540-3548.

- Ercolini, D., 2004. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods* 56, 297-314.
- Ercolini, D., 2013. High-throughput sequencing and metagenomics: moving forward in the culture-independent analysis of food microbial ecology. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 3148-3155.
- Ercolini, D., Pontonio, E., De Filippis, F., Minervini, F., La Stora, A., Gobbetti, M., Di Cagno, R., 2013. Microbial ecology dynamics during rye and wheat sourdough preparation. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 7827-7836.
- Ferchichi, M., Valcheva, R., Prévost, H., Onno, B., Dousset, X., 2007. Molecular identification of the microbiota of French sourdough using temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Food Microbiology* 24, 678-686.
- Ferchichi, M., Valcheva, R., Prévost, H., Onno, B., Dousset, X., 2008. Rapid identification of *Lactobacillus nantensis*, *Lactobacillus spicheri* and *Lactobacillus hammesii* species using species-specific primers. *International Journal of Food Microbiology* 123, 269-276.
- Galle, S., Arendt, E.K., 2013. Exopolysaccharides from sourdough lactic acid bacteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 54, 891-901.
- Gänzle, M.G., 2014. Enzymatic and bacterial conversions during sourdough fermentation. *Food Microbiology* 37, 2-10.
- Gänzle, M.G., Vermeulen, N., Vogel, R.F., 2007. Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough. *Food Microbiology* 24, 128-138.
- Gänzle, M.G., Vogel, R.F., 2003. Contribution of reutericyclin production to the stable persistence of *Lactobacillus reuteri* in an industrial sourdough fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 80, 31-45.
- Gobbetti, M., De Angelis, M., Corsetti, A., Di Cagno, R., 2005. Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. *Trends in Food Science & Technology* 16, 57-69.
- Gori, K., Bjorklund, M.K., Canibe, N., Pedersen, A.O., Jespersen, L., 2011. Occurrence and identification of yeast species in fermented liquid feed for piglets. *Microbial Ecology* 61, 146-153.
- Granato, D., de Araújo Calado, V.M., Jarvis, B., 2014. Observations on the use of statistical methods in Food Science and Technology. *Food Research International* 55, 137-149.
- Groenewald, W.H., Van Reenen, C.A., Todorov, S.D., Toit, M.D., Witthuhn, R.C., Holzapfel, W.H., Dicks, L.M.T., 2006. Identification of lactic acid bacteria from vinegar flies based on phenotypic and genotypic characteristics. *American Journal of Enology and Viticulture* 57, 519-525.
- Gullo, M., Romano, A.D., Pulvirenti, A., Giudici, P., 2003. *Candida humilis*—dominant species in sourdoughs for the production of durum wheat bran flour bread. *International Journal of Food Microbiology* 80, 55-59.
- Hammes, W.P., Brandt, M.J., Francis, K.L., Rosenheim, J., Seitter, M.F.H., Vogelmann, S.A., 2005. Microbial ecology of cereal fermentations. *Trends in Food Science & Technology* 16, 4-11.
- Huys, G., Daniel, H.-M., De Vuyst, L., 2013. Taxonomy and biodiversity of sourdough yeasts and lactic acid bacteria, *Handbook on Sourdough Biotechnology*. Springer, pp. 105-154



- Iacumin, L., Cecchini, F., Manzano, M., Osualdini, M., Boscolo, D., Orlic, S., Comi, G., 2009. Description of the microflora of sourdoughs by culture-dependent and culture-independent methods. *Food Microbiology* 26, 128-135.
- Jaffrès, E., Sohier, D., Leroi, F., Pilet, M.F., Prévost, H., Joffraud, J.J., Dousset, X., 2009. Study of the bacterial ecosystem in tropical cooked and peeled shrimps using a polyphasic approach. *International Journal of Food Microbiology* 131, 20-29.
- Kan, V.L., 1993. Polymerase chain reaction for the diagnosis of candidemia. *Journal of Infectious Diseases* 168, 779-783.
- Kurtzman, C.P., Robnett, C.J., 2003. Phylogenetic relationships among yeasts of the '*Saccharomyces* complex' determined from multigene sequence analyses. *FEMS Yeast Research* 3, 417-432.
- Lattanzi, A., Minervini, F., Di Cagno, R., Diviccaro, A., Antonielli, L., Cardinali, G., Cappelle, S., De Angelis, M., Gobbetti, M., 2013. The lactic acid bacteria and yeast microbiota of eighteen sourdoughs used for the manufacture of traditional Italian sweet leavened baked goods. *International Journal of Food Microbiology* 163, 71-79.
- Marcon, E., Morneau, F., 2010. Mesures de la biodiversité.
- Meroth, C.B., Hammes, W.P., Hertel, C., 2003a. Identification and population dynamics of yeasts in sourdough fermentation processes by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 7453-7461.
- Meroth, C.B., Hammes, W.P., Hertel, C., 2004. Characterisation of the microbiota of rice sourdoughs and description of *Lactobacillus spicheri* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology* 27, 151-159.
- Meroth, C.B., Walter, J., Hertel, C., Brandt, M.J., Hammes, W.P., 2003b. Monitoring the bacterial population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 475-482.
- Middelhoven, W., Kurtzman, C., Vaughan-Martini, A., 2000. *Saccharomyces bulderi* sp. nov., a yeast that ferments gluconolactone. *Antonie van Leeuwenhoek* 77, 223-228.
- Minervini, F., Di Cagno, R., Lattanzi, A., De Angelis, M., Antonielli, L., Cardinali, G., Cappelle, S., Gobbetti, M., 2012a. Lactic acid bacterium and yeast microbiotas of 19 sourdoughs used for traditional/typical Italian breads: interactions between ingredients and microbial species diversity. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 1251-1264.
- Minervini, F., Lattanzi, A., De Angelis, M., Di Cagno, R., Gobbetti, M., 2012b. Influence of artisan bakery- or laboratory- propagated sourdoughs on the diversity of lactic acid bacterium and yeast microbiotas. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 5328-5340.
- Nguyen, H.-V., Gaillardin, C., 1997. Two subgroups within the *Saccharomyces bayanus* species evidenced by PCR amplification and restriction polymorphism of the non-transcribed spacer 2 in the ribosomal DNA unit. *Systematic and Applied Microbiology* 20, 286-294.
- Nguyen, H.-V., Gaillardin, C., Neuvéglise, C., 2009. Differentiation of *Debaryomyces hansenii* and *Candida famata* by rRNA gene intergenic spacer fingerprinting and reassessment of phylogenetic relationships among *D. hansenii*, *C. famata*, *D. fabryi*, *C. flarer* (= *D. subglobosus*) and *D. prosopidis*: description of *D. vietnamensis* sp. nov. closely related to *D. nepalensis*. *FEMS Yeast Research* 9, 641-662.



- Nuobariene, L., Hansen, Å.S., Arneborg, N., 2012. Isolation and identification of phytase-active yeasts from sourdoughs. *LWT - Food Science and Technology* 48, 190-196.
- O'Donnell, K., 1993. *Fusarium* and its near relatives. The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics, 225-233.
- Palomba, S., Blaiotta, G., Ventrino, V., Saccone, A., Pepe, O., 2010. Microbial characterization of sourdough for sweet baked products in the Campania region (southern Italy) by a polyphasic approach. *Annals of Microbiology* 61, 307-314.
- Parayre, S., Falentin, H., Madec, M.-N., Sivieri, K., Le Dizes, A.-S., Sohler, D., Lortal, S., 2007. Easy DNA extraction method and optimisation of PCR-temporal temperature gel electrophoresis to identify the predominant high and low GC-content bacteria from dairy products. *Journal of Microbiological Methods* 69, 431-441.
- Poutanen, K., Flander, L., Katina, K., 2009. Sourdough and cereal fermentation in a nutritional perspective. *Food Microbiology* 26, 693-699.
- Reale, A., Di Renzo, T., Succi, M., Tremonte, P., Coppola, R., Sorrentino, E., 2013. Microbiological and fermentative properties of baker's yeast starter used in breadmaking. *Journal of Food Science* 78, M1224-1231.
- Robert, H., Gabriel, V., Fontagné-Faucher, C., 2009. Biodiversity of lactic acid bacteria in French wheat sourdough as determined by molecular characterization using species-specific PCR. *International Journal of Food Microbiology* 135, 53-59.
- Rosenquist, H., Hansen, A., 2000. The microbial stability of two bakery sourdoughs made from conventionally and organically grown rye. *Food Microbiology* 17, 241-250.
- Scheirlinck, I., Van der Meulen, R., Van Schoor, A., Vancanneyt, M., De Vuyst, L., Vandamme, P., Huys, G., 2007. Influence of geographical origin and flour type on diversity of lactic acid bacteria in traditional Belgian sourdoughs. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 6262-6269.
- Scheirlinck, I., Van der Meulen, R., Van Schoor, A., Vancanneyt, M., De Vuyst, L., Vandamme, P., Huys, G., 2008. Taxonomic structure and stability of the bacterial community in Belgian sourdough ecosystems as assessed by culture and population fingerprinting. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 2414-2423.
- Shannon, C.E., Weaver, W., 1949. 77 mathematical theory of communication. Urbana: University of Illinois Press.
- Simpson, E.H., 1949. Measurement of diversity. *Nature* 163, 688.
- Siragusa, S., Di Cagno, R., Ercolini, D., Minervini, F., Gobetti, M., De Angelis, M., 2009. Taxonomic structure and monitoring of the dominant population of lactic acid bacteria during wheat flour sourdough type I propagation using *Lactobacillus sanfranciscensis* starters. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 1099-1109.
- Stackebrandt, E., Ebers, J., 2006. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology today* 33, 152.
- Torriani, S., Felis, G.E., Dellaglio, F., 2001. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by recA gene sequence analysis and multiplex PCR assay with recA gene-derived primers. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 3450-3454.

- Valcheva, R., Ferchichi, M.F., Korakli, M., Ivanova, I., Gänzle, M.G., Vogel, R.F., Prévost, H., Onno, B., Dousset, X., 2006. *Lactobacillus nantensis* sp. nov., isolated from French wheat sourdough. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 56, 587-591.
- Valcheva, R., Korakli, M., Onno, B., Prévost, H., Ivanova, I., Ehrmann, M.A., Dousset, X., Gänzle, M.G., Vogel, R.F., 2005. *Lactobacillus hammesii* sp. nov., isolated from French sourdough. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 55, 763-767.
- Valmorri, S., Tofalo, R., Settanni, L., Corsetti, A., Suzzi, G., 2010. Yeast microbiota associated with spontaneous sourdough fermentations in the production of traditional wheat sourdough breads of the Abruzzo region (Italy). Antonie van Leeuwenhoek 97, 119-129.
- Venturi, M., Guerrini, S., Granchi, L., Vincenzini, M., 2012. Typing of *Lactobacillus sanfranciscensis* isolates from traditional sourdoughs by combining conventional and multiplex RAPD-PCR profiles. International Journal of Food Microbiology 156, 122-126.
- Vera, A., Ly-Chatain, M.H., Rigobello, V., Demarigny, Y., 2011. Description of a French natural wheat sourdough over 10 consecutive days focussing on the *lactobacilli* present in the microbiota. Antonie van Leeuwenhoek 101, 369-377.
- Vernocchi, P., Valmorri, S., Gatto, V., Torriani, S., Gianotti, A., Suzzi, G., Guerzoni, M.E., Gardini, F., 2004. A survey on yeast microbiota associated with an Italian traditional sweet-leavened baked good fermentation. Food Research International 37, 469-476.
- Vogel, R., Pavlovic, M., Ehrmann, M., Wiezer, A., Liesegang, H., Offschanka, S., Voget, S., Angelov, A., Bocker, G., Liebl, W., 2011. Genomic analysis reveals *Lactobacillus sanfranciscensis* as stable element in traditional sourdoughs. Microbial Cell Factories 10, S6.
- Vogelmann, S.A., Hertel, C., 2011. Impact of ecological factors on the stability of microbial associations in sourdough fermentation. Food Microbiology 28, 583-589.
- Vogelmann, S.A., Seitter, M., Singer, U., Brandt, M.J., Hertel, C., 2009. Adaptability of lactic acid bacteria and yeasts to sourdoughs prepared from cereals, pseudocereals and cassava and use of competitive strains as starters. International Journal of Food Microbiology 130, 205-212.
- Vrancken, G., Rimaux, T., Weckx, S., Leroy, F., De Vuyst, L., 2011a. Influence of temperature and backslopping time on the microbiota of a type I propagated laboratory wheat sourdough fermentation. Applied and Environmental Microbiology 77, 2716-2726.
- Vrancken, G., De Vuyst, L., Rimaux, T., Allemeersch, J., Weckx, S., 2011b. Adaptation of *Lactobacillus plantarum* IMDO 130201, a wheat sourdough isolate, to growth in wheat sourdough simulation medium at different pH values through differential gene expression. Applied and Environmental Microbiology 77, 3406-3412.
- Vrancken, G., De Vuyst, L., Van der Meulen, R., Huys, G., Vandamme, P., Daniel, H.-M., 2010. Yeast species composition differs between artisan bakery and spontaneous laboratory sourdoughs. FEMS Yeast Research 10, 471-481.
- Weckx, S., Van der Meulen, R., Maes, D., Scheirlinck, I., Huys, G., Vandamme, P., De Vuyst, L., 2010. Lactic acid bacteria community dynamics and metabolite production of rye sourdough fermentations share characteristics of wheat and spelt sourdough fermentations. Food Microbiology 27, 1000-1008.

- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173, 697-703.
- Yoon, J.H., Kang, S.S., Mheen, T.I., Ahn, J.S., Lee, H.J., Kim, T.K., Park, C.S., Kho, Y.H., Kang, K.H., Park, Y.H., 2000. *Lactobacillus kimchii* sp. nov., a new species from kimchi. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 1789-1795.
- Zhang, J., Liu, W., Sun, Z., Bao, Q., Wang, F., Yu, J., Chen, W., Zhang, H., 2011. Diversity of lactic acid bacteria and yeasts in traditional sourdoughs collected from western region in Inner Mongolia of China. *Food Control* 22, 767-774.

**Supplementary material S1:** Characteristics of the sourdough from the five selected bakeries and sampling periods.

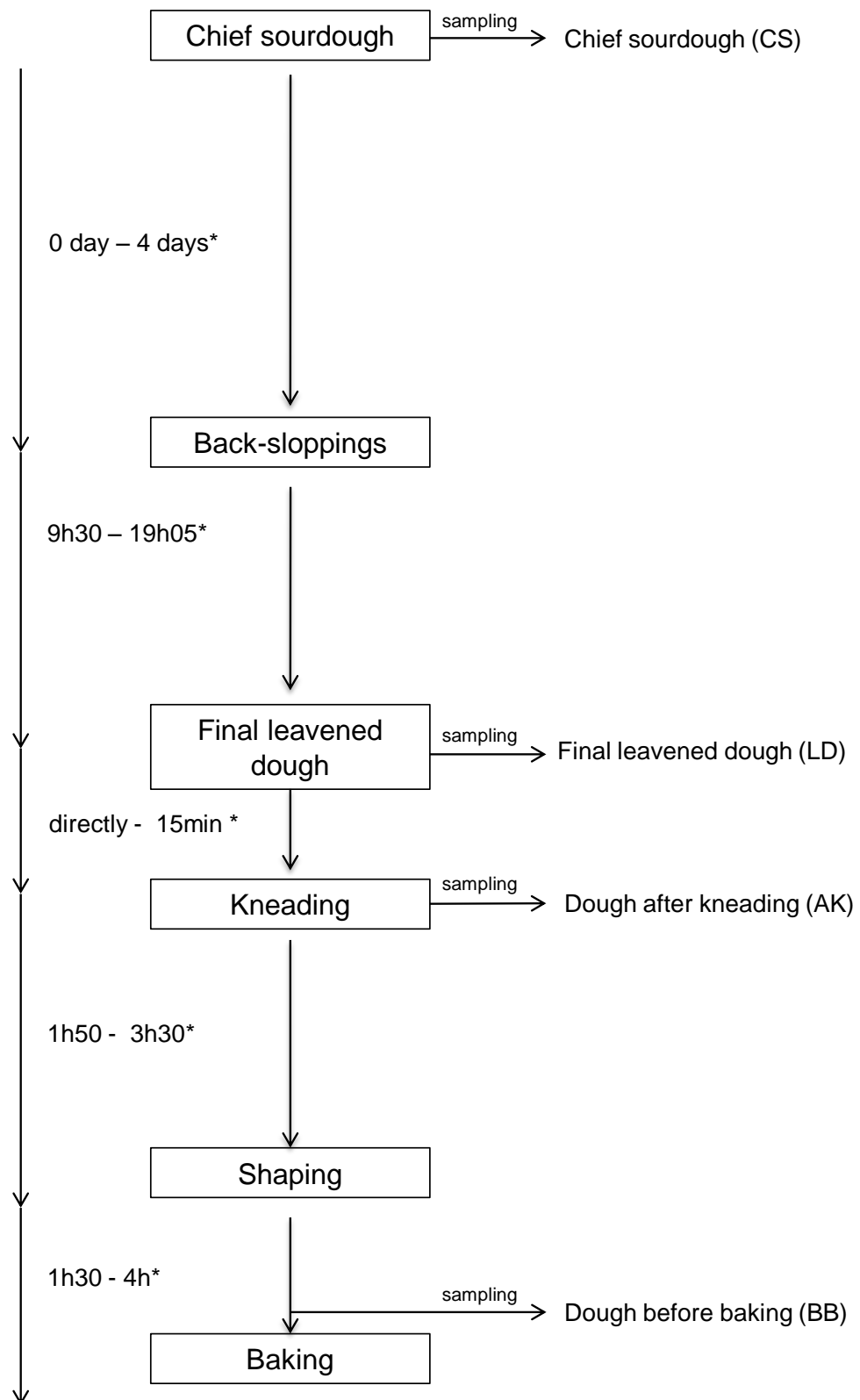
Bakery	1	2	3	4	5
Location	Poitou-Charentes	Lot-et-Garonne	Rhône-Alpes	Pays de la Loire	Picardie
First bread-making run date	February 2012	March 2012	March 2012	April 2012	May 2012
Second bread-making run date	November 2012	December 2012	January 2013	January 2013	December 2012
Farmer (F) / Non farmer (NF)	F	F	F	NF	NF
Flour in chief sourdough	Wheat	Wheat	Wheat (50%) + rye (50 %) <sup>d</sup>	Wheat	Wheat
Hydration of sourdough (%)	87	75	82	73	58
No. of back-slopping steps before use	2	3	2	1	1
Temp (°C) of back-slopping <sup>a</sup>	22.5	21	23	22.6	24.1
Period (h) of back-slopping <sup>a</sup>	6h30	6h	11h	14h	17h30
Sourdough <sup>b</sup> (%)	43	16	15.1	33	9.9
Flour <sup>b</sup> (%)	37	44	49.4	39.4	53.8
Water <sup>b</sup> (%)	19	38	35	27	34.8
Salt <sup>b</sup> (%)	0.9	1.3	0.8	0.8	1.5
Kneading method <sup>c</sup>	Me	Me	Ma	Me	Me
Total period of fermentation	4h30	6h50	4h45	4h20	5h50

<sup>a</sup> Mature sourdough, after the last back-slopping

<sup>b</sup> Percentage of total dough weight

<sup>c</sup> Mechanically (Me) or manually (Ma)

<sup>d</sup> For the second bread-making run, only wheat flour was used



**Supplementary material S2:** Bread making process and experimental design for sampling.

\* Range of time depends on each bakery's practices

**Supplementary Material S3:** List of the reference strains used in this study

*Lactobacillus brevis* CIP 102806<sup>T</sup>  
*Lactobacillus hammesii* CIP 108546<sup>T</sup>  
*Lactobacillus kimchii* DSM13961<sup>T</sup>  
*Lactobacillus paraplantarum* 1888  
*Lactobacillus plantarum* ATCC 14917<sup>T</sup>  
*Lactobacillus sanfranciscensis* ATCC 43322  
*Lactobacillus sanfranciscensis* CIP 103252<sup>T</sup>  
*Saccharomyces cerevisiae* CLIB 227<sup>T</sup>  
*Kazachstania unispora* CLIB 234<sup>T</sup>  
*Kazachstania exigua* CLIB 179<sup>T</sup>  
*Kazachstania bulderi* CLIB 596<sup>T</sup>  
*Candida humilis* CLIB 1323<sup>T</sup>  
*Torulaspora delbrueckii* CLIB 230<sup>T</sup>  
*Candida carpophila* CLIB 1330<sup>T</sup>  
*Hyphopichia pseudoburtonii* CLIB 35<sup>T</sup>

CIP : Collection of Institut Pasteur ; DSM : Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen ; ATCC : American Type Culture Collection ; CLIB : Collection de Levures d'Intérêt Biotechnologique, collection of CIRM-Levures



**Supplementary material S4:** Sequences of oligonucleotide primers used for PCR amplification and sequencing

Primer set	Oligonucleotide sequence (5' → 3')	Sequence length (bp)	Target genomic region	Reference
fD1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1500	16S rRNA gene	Weisburg <i>et al.</i> (1991)
rD1	TAAGGAGGTGATCCAGCC			
SP1	ACTCCTACGGGAGGCAGCA			
SP2	ACCGCGGCTGCTGGCACG	1280	16S rRNA gene	This study
SP3	GATACCCTGGTAGTCCACG			
SP5	GGTACCTTGTACGACTT			
planF	CCGTTTATGCGCAACACCTA	318 for <i>Lb. plantarum</i>	<i>recA</i>	Torriani <i>et al.</i> (2001)
pentF	CAGTGGCGCGGTTGATAT	218 for <i>Lb. pentosus</i>		
paraF	GTCACAGGCATTACGAAAAC	107 for <i>Lb. paraplantarum</i>		
preV	TCGGGATTACCAAACATCAC			
Lham	TTGACCGCAAGGTCATCATTTT	196	16S-23S rDNA intergenic spacer region (ISR)	Ferchichi <i>et al.</i> (2006)
23S/p7	GGTACTTAGATGTTTCAGTTC			
702-F	AATTGCCTTCTCCGTGT A	407	<i>katA</i>	Ammor <i>et al.</i> (2005)
310-R	AGTTGCGCACAATTATTT TC			
V3P1	CCTACGGGAGGCAGCAG	194	16S rRNA gene	Parayre <i>et al.</i> (2007)
V3P3	ATTACCGCGGCTGCTGG with GC-clamp			
SR21	CTTAATCTTTGAGACAAGC	2540	intergenic spacer rDNA	Nguyen <i>et al.</i> (2009)
LR13	CGATCTGCTGAGATTAAG			
NL1	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	550	26S gene D1/D2 region ribosomal gene	O'Donnell (1993)
NL4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG			
CA5R	GTGAACAATGGATGGACCAGATTCGTCG	800	<i>ACT1</i> gene	Kan (1993)
CA14	AACTGGGATGACATGGAGAAGATCTGGC			



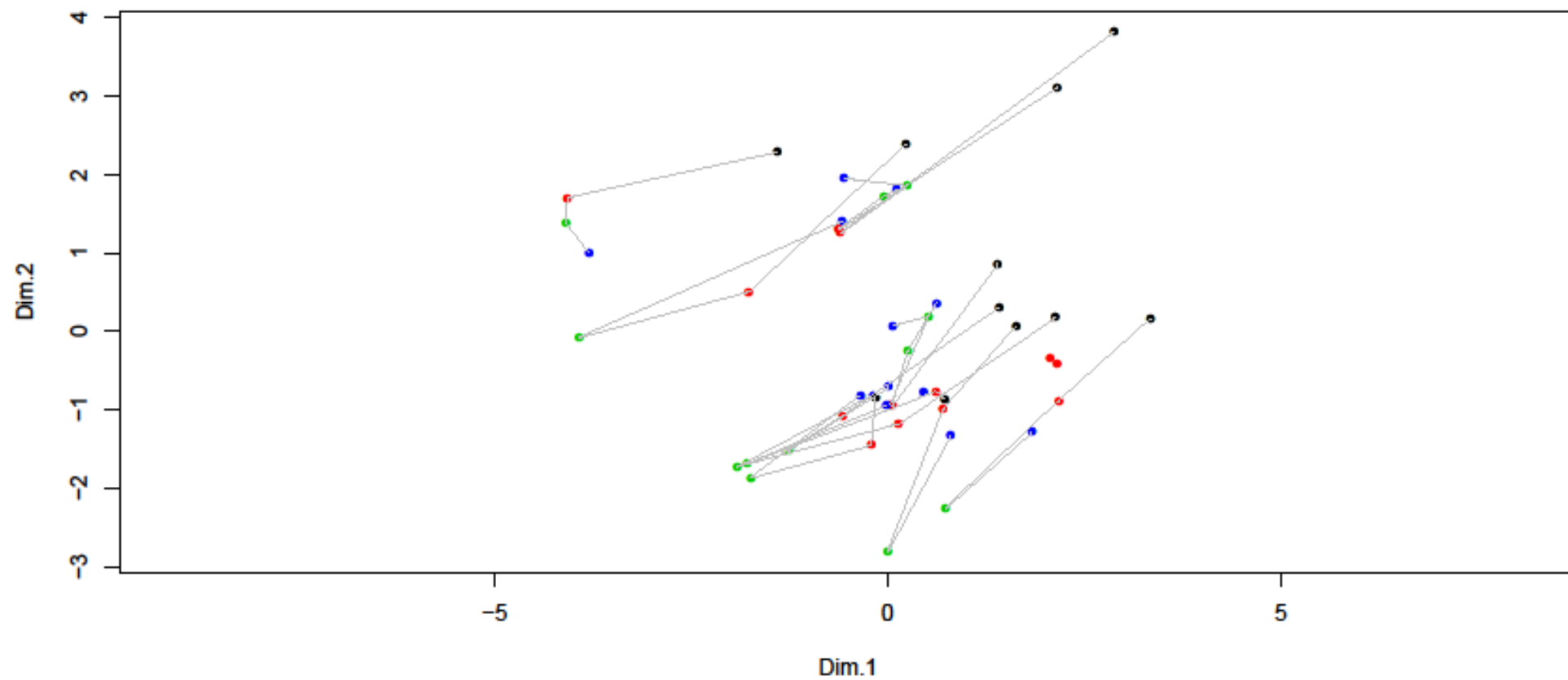
Supplementary Material S5: Physico-chemical characterization and microbial counts for each Bakery (B) from the two bread-making runs (BMR1 and BMR2) according to the sample step (CS: chief sourdough; LSD: final leavened dough; AK: after kneading; BB: before baking) and the dough replicate (R1 = dough replicate 1 or R2 = dough replicate 2). Results are means  $\pm$  standard deviation (n = 3).

Sample	pH	TTA (mL NaOH 0.1 / 10g)	[lactic acid] g/kg	[acid acetic] g/kg	Log <sub>10</sub> LAB count (CFU/g)	Log <sub>10</sub> Yeast count (CFU/g)
B1_BMR1_CS_R1	3.90 $\pm$ 0.00	14.17 $\pm$ 0.96	7.96 $\pm$ 0.52	0.93 $\pm$ 0.05	9.25 $\pm$ 0.04	4.74 $\pm$ 0.11
B1_BMR1_LD_R1	4.30 $\pm$ 0.00	10.57 $\pm$ 3.11	5.19 $\pm$ ND	0.46 $\pm$ ND	8.85 $\pm$ 0.11	3.66 $\pm$ 0.40
B1_BMR1_AK_R1	4.50 $\pm$ 0.00	8.00 $\pm$ 0.70	6.32 $\pm$ ND	0.51 $\pm$ ND	8.99 $\pm$ 0.12	4.08 $\pm$ 0.09
B1_BMR1_BB_R1	4.30 $\pm$ 0.00	9.90 $\pm$ 1.82	4.32 $\pm$ ND	0.43 $\pm$ ND	8.93 $\pm$ 0.01	4.18 $\pm$ 0.04
B1_BMR2_CS_R1	3.74 $\pm$ 0.04	27.30 $\pm$ 3.90	9.72 $\pm$ 1.00	1.92 $\pm$ ND	9.00 $\pm$ 0.04	5.66 $\pm$ 0.02
B1_BMR2_CS_R2	3.69 $\pm$ 0.06	31.30 $\pm$ 4.10	11.30 $\pm$ 1.44	2.03 $\pm$ ND	9.05 $\pm$ 0.09	5.67 $\pm$ 0.08
B1_BMR2_LD_R1	3.79 $\pm$ 0.00	15.43 $\pm$ 0.75	6.98 $\pm$ 0.20	0.66 $\pm$ ND	9.21 $\pm$ 0.05	5.55 $\pm$ 0.04
B1_BMR2_LD_R2	3.84 $\pm$ 0.01	15.50 $\pm$ 0.71	7.00 $\pm$ 1.37	0.81 $\pm$ ND	9.16 $\pm$ 0.07	5.56 $\pm$ 0.06
B1_BMR2_AK_R1	3.76 $\pm$ 0.03	19.10 $\pm$ 3.38	8.45 $\pm$ ND	0.73 $\pm$ ND	9.14 $\pm$ 0.09	5.57 $\pm$ 0.07
B1_BMR2_AK_R2	3.70 $\pm$ 0.03	19.50 $\pm$ 2.55	8.45 $\pm$ 0.13	0.84 $\pm$ ND	9.22 $\pm$ 0.06	5.67 $\pm$ ND
B1_BMR2_BB_R1	3.74 $\pm$ 0.02	21.50 $\pm$ 2.76	8.19 $\pm$ ND	0.64 $\pm$ ND	9.24 $\pm$ 0.04	5.66 $\pm$ 0.06
B1_BMR2_BB_R2	3.76 $\pm$ 0.03	17.35 $\pm$ 0.92	7.95 $\pm$ ND	0.66 $\pm$ ND	9.57 $\pm$ 0.12	5.56 $\pm$ 0.03
B2_BMR1_CS_R1	3.83 $\pm$ 0.06	15.77 $\pm$ 0.40	11.34 $\pm$ 0.56	1.18 $\pm$ 0.56	9.01 $\pm$ 0.13	5.34 $\pm$ 0.09
B2_BMR1_LD_R1	4.26 $\pm$ 0.06	11.57 $\pm$ 0.75	6.59 $\pm$ ND	0.78 $\pm$ ND	8.81 $\pm$ 0.06	5.27 $\pm$ 0.03
B2_BMR1_AK_R1	4.74 $\pm$ 0.06	7.90 $\pm$ 0.17	4.21 $\pm$ ND	0.55 $\pm$ ND	8.80 $\pm$ 0.07	4.67 $\pm$ 0.10
B2_BMR1_BB_R1	4.02 $\pm$ 0.04	12.87 $\pm$ 4.21	9.35 $\pm$ ND	0.98 $\pm$ ND	9.10 $\pm$ 0.01	5.59 $\pm$ 0.10
B2_BMR2_CS_R1	3.74 $\pm$ 0.04	25.35 $\pm$ 2.76	6.14 $\pm$ ND	1.17 $\pm$ ND	8.43 $\pm$ 0.11	6.04 $\pm$ 0.07
B2_BMR2_LD_R1	3.79 $\pm$ 0.00	16.43 $\pm$ 0.75	3.47 $\pm$ ND	0.67 $\pm$ ND	8.46 $\pm$ 0.09	6.52 $\pm$ 0.09
B2_BMR2_LD_R2	3.84 $\pm$ 0.01	15.40 $\pm$ 0.85	4.27 $\pm$ ND	0.68 $\pm$ ND	8.41 $\pm$ 0.06	6.51 $\pm$ 0.02
B2_BMR2_AK_R1	3.76 $\pm$ 0.03	19.10 $\pm$ 3.38	4.61 $\pm$ ND	0.74 $\pm$ ND	8.33 $\pm$ 0.07	6.04 $\pm$ 0.03
B2_BMR2_AK_R2	3.73 $\pm$ 0.03	22.30 $\pm$ 5.17	6.64 $\pm$ ND	0.44 $\pm$ ND	8.34 $\pm$ 0.05	5.97 $\pm$ 0.07
B2_BMR2_BB_R1	3.76 $\pm$ 0.03	21.50 $\pm$ 2.76	5.26 $\pm$ ND	0.90 $\pm$ ND	8.58 $\pm$ 0.08	6.09 $\pm$ 0.08
B2_BMR2_BB_R2	3.74 $\pm$ 0.02	18.67 $\pm$ 2.37	6.32 $\pm$ ND	0.42 $\pm$ ND	8.59 $\pm$ 0.01	6.06 $\pm$ 0.04
B3_BMR1_CS_R1	3.85 $\pm$ 0.07	19.00 $\pm$ 0.00	11.44 $\pm$ 0.10	1.94 $\pm$ 0.04	7.55 $\pm$ 0.09	7.17 $\pm$ 0.03
B3_BMR1_LD_R1	3.90 $\pm$ 0.00	16.23 $\pm$ 0.40	9.34 $\pm$ ND	1.27 $\pm$ ND	7.71 $\pm$ 0.14	7.39 $\pm$ 0.01
B3_BMR1_AK_R1	4.13 $\pm$ 0.06	11.80 $\pm$ 1.01	6.34 $\pm$ ND	1.09 $\pm$ ND	7.06 $\pm$ 0.15	6.76 $\pm$ 0.04
B3_BMR1_BB_R1	3.90 $\pm$ 0.00	15.30 $\pm$ 0.00	9.12 $\pm$ ND	1.05 $\pm$ ND	7.42 $\pm$ 0.11	7.15 $\pm$ 0.01
B3_BMR2_CS_R1	3.76 $\pm$ 0.04	19.10 $\pm$ 1.71	6.06 $\pm$ ND	1.65 $\pm$ ND	8.93 $\pm$ 0.07	7.56 $\pm$ 0.04
B3_BMR2_CS_R2	3.89 $\pm$ 0.02	21.30 $\pm$ 2.00	3.29 $\pm$ ND	0.66 $\pm$ ND	9.03 $\pm$ 0.10	7.52 $\pm$ 0.04
B3_BMR2_LD_R1	3.92 $\pm$ 0.11	12.00 $\pm$ 3.25	5.28 $\pm$ ND	0.64 $\pm$ ND	8.99 $\pm$ 0.03	7.52 $\pm$ 0.03
B3_BMR2_LD_R2	3.84 $\pm$ 0.04	16.00 $\pm$ 1.30	5.29 $\pm$ ND	0.67 $\pm$ ND	9.04 $\pm$ 0.04	7.49 $\pm$ 0.04
B3_BMR2_AK_R1	4.81 $\pm$ 0.45	11.13 $\pm$ 2.02	4.17 $\pm$ ND	0.76 $\pm$ ND	8.67 $\pm$ 0.02	6.69 $\pm$ 0.05
B3_BMR2_AK_R2	4.59 $\pm$ 0.01	10.67 $\pm$ 2.37	3.86 $\pm$ ND	0.44 $\pm$ ND	8.75 $\pm$ 0.01	6.63 $\pm$ 0.07
B3_BMR2_BB_R1	3.87 $\pm$ 0.06	14.73 $\pm$ 2.30	4.52 $\pm$ ND	0.51 $\pm$ ND	8.98 $\pm$ 0.10	7.16 $\pm$ 0.04
B3_BMR2_BB_R2	4.01 $\pm$ 0.03	14.23 $\pm$ 1.36	4.31 $\pm$ ND	0.71 $\pm$ ND	9.13 $\pm$ 0.03	7.15 $\pm$ 0.03
B4_BMR1_CS_R1	3.90 $\pm$ 0.00	17.80 $\pm$ 0.35	9.98 $\pm$ ND	0.99 $\pm$ ND	8.50 $\pm$ 0.06	7.18 $\pm$ 0.08
B4_BMR1_LD_R1	4.00 $\pm$ 0.00	14.67 $\pm$ 0.06	9.14 $\pm$ ND	0.46 $\pm$ ND	8.24 $\pm$ 0.04	7.17 $\pm$ 0.08
B4_BMR1_AK_R1	4.20 $\pm$ 0.00	11.57 $\pm$ 0.75	5.00 $\pm$ ND	0.62 $\pm$ ND	7.24 $\pm$ 0.04	6.88 $\pm$ 0.15
B4_BMR1_BB_R1	4.00 $\pm$ 0.00	15.53 $\pm$ 0.81	8.20 $\pm$ ND	0.55 $\pm$ ND	7.84 $\pm$ 0.05	6.99 $\pm$ 0.02
B4_BMR2_CS_R1	3.76 $\pm$ 0.10	16.43 $\pm$ 0.38	6.95 $\pm$ ND	1.70 $\pm$ ND	7.87 $\pm$ 0.30	6.00 $\pm$ 0.03

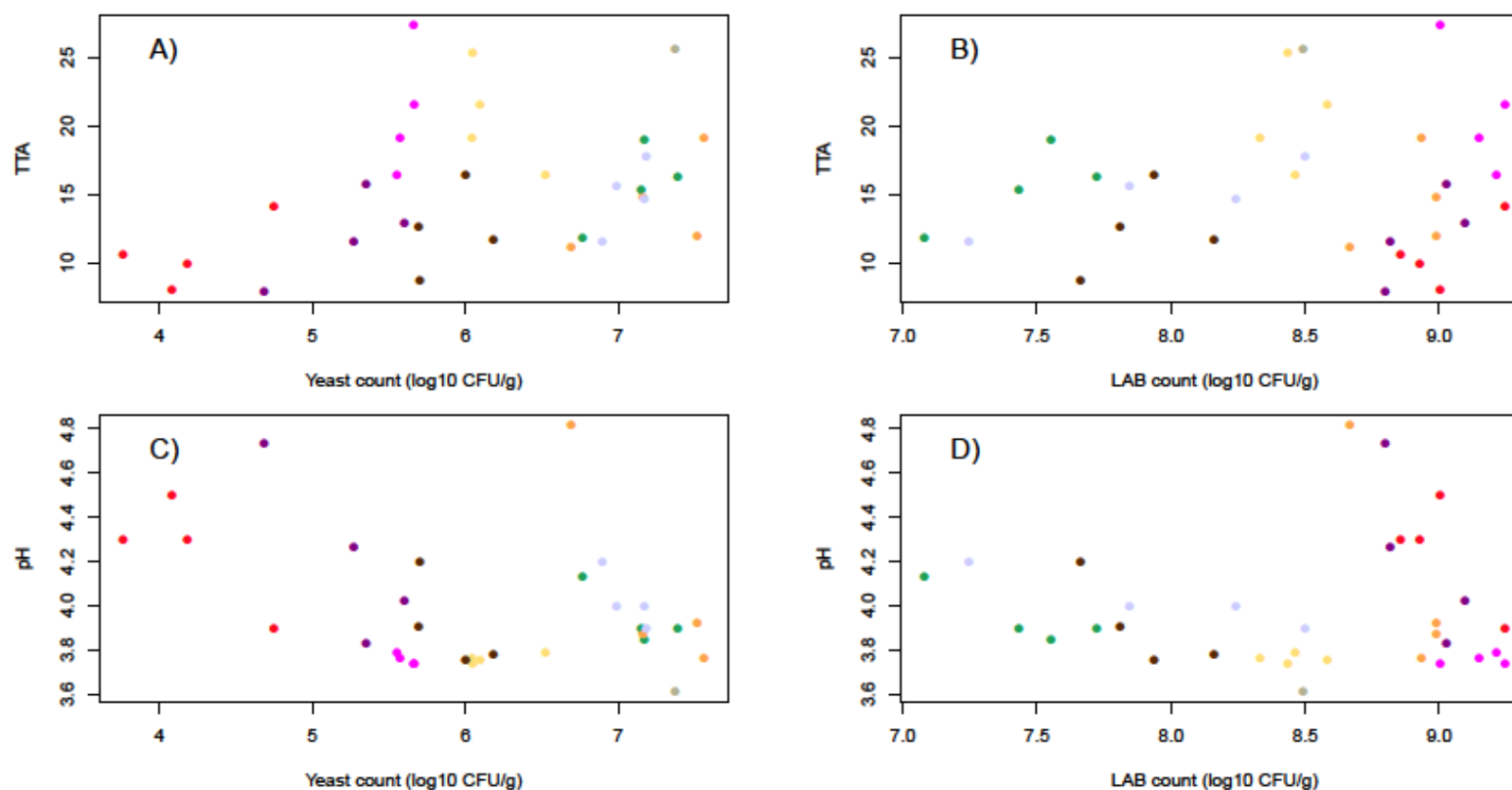
B4_BMR2_CS_R2	3.73 ± 0.08	12.23 ± 0.40	5.01 ± ND	0.75 ± ND	8.02 ± 0.21	5.87 ± 0.38
B4_BMR2_LD_R1	3.91 ± 0.06	12.60 ± 1.55	4.47 ± ND	0.73 ± ND	7.81 ± 0.07	5.69 ± 0.04
B4_BMR2_LD_R2	3.80 ± 0.04	13.50 ± 1.91	4.32 ± ND	0.56 ± ND	7.71 ± 0.29	6.06 ± 0.05
B4_BMR2_AK_R1	4.20 ± 0.03	8.67 ± 3.78	6.46 ± ND	0.48 ± ND	7.66 ± 0.01	5.70 ± 0.05
B4_BMR2_AK_R2	4.26 ± 0.04	7.27 ± 0.23	4.25 ± ND	0.57 ± ND	7.77 ± 0.09	5.71 ± 0.03
B4_BMR2_BB_R1	3.78 ± 0.09	11.60 ± 0.40	6.46 ± ND	0.73 ± ND	8.16 ± 0.07	6.18 ± 0.08
B4_BMR2_BB_R2	3.87 ± 0.06	13.77 ± 0.40	5.22 ± ND	0.59 ± ND	8.23 ± 0.14	6.11 ± 0.01
B5_BMR2_LD_R1	3.61 ± 0.05	25.67 ± 0.81	5.86 ± ND	0.7 ± ND	8.49 ± 0.08	7.37 ± 0.04
B5_BMR2_LD_R2	3.46 ± 0.06	22.60 ± ND	6.14 ± ND	0.79 ± ND	8.30 ± 0.03	7.23 ± 0.02
B5_BMR2_BB_R2	3.66 ± 0.07	16.60 ± 2.17	5.55 ± ND	0.44 ± ND	8.37 ± 0.24	6.64 ± 0.03

**Supplementary material S6:** Results of the statistical test of the effect of factors on the variations in LAB and yeast counts.

	Factors	Standard deviation [CI 95%]	Statistical value	p-value
LAB	Method		0.42	0.51
	Process step		25.18	<10 <sup>-4</sup>
	Bakery	0.25 [0.008;8.38]	-3.98x10 <sup>-8</sup>	0.33
	Bread making run	0.59 [0.31;1.11]	74.98	<10 <sup>-5</sup>
	Dough replicate	0.20 [0.16;0.25]	96.51	<10 <sup>-5</sup>
	Residuals	0.11 [0.10;0.13]		
yeast	Method		4.82	0.03
	Process step		36.40	<10 <sup>-4</sup>
	Bakery	0.46 [0.08;2.79]	0.02	0.21
	Bread making run	0.68 [0.36;1.27]	85.46	<10 <sup>-5</sup>
	Dough replicate	0.22 [0.18;0.27]	171.04	<10 <sup>-4</sup>
	Residuals	0.09 [0.08;0.10]		



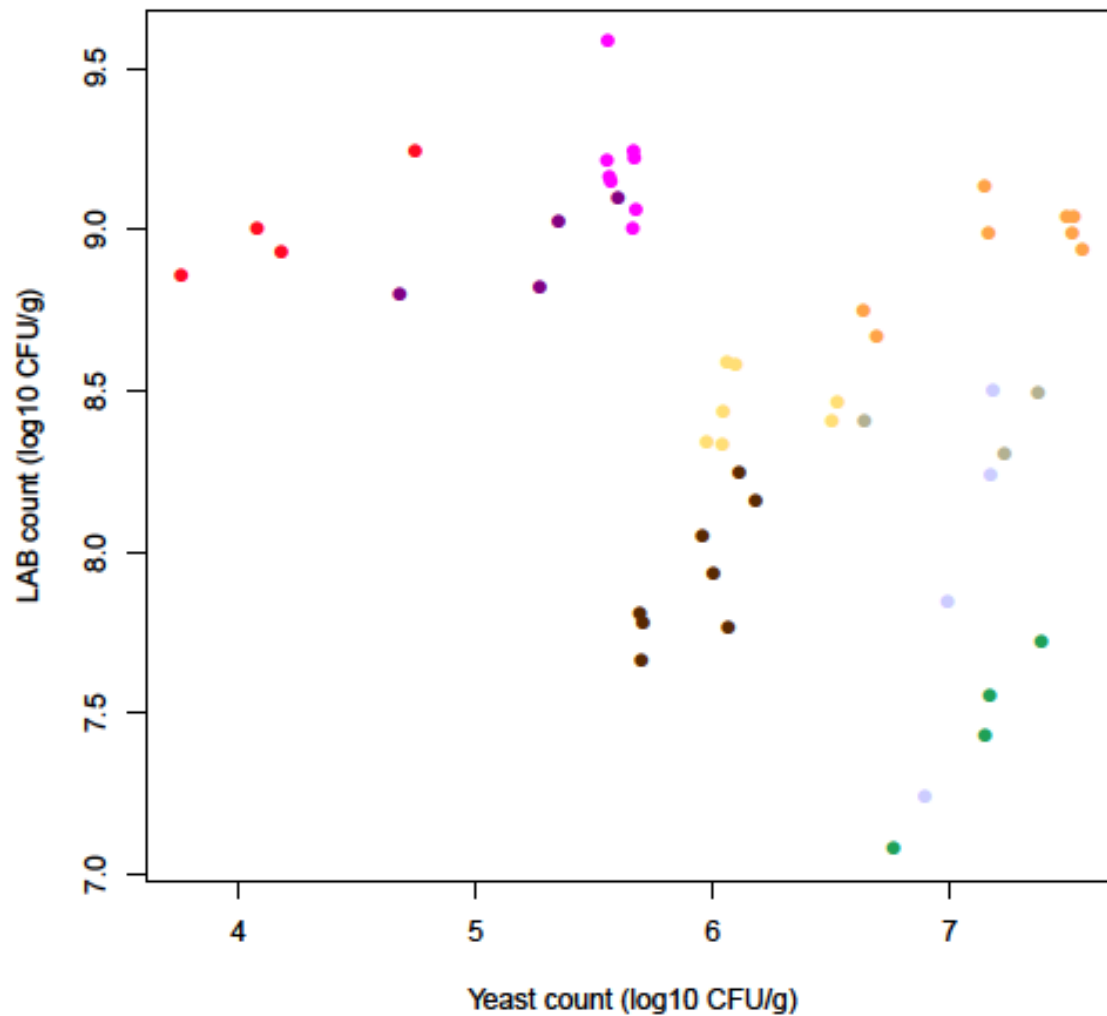
Supplementary Material S7: Individuals factor map on 1& 2 axes colored by steps: black = Chief Sourdough; red = final leavened dough; green = dough after kneading; blue = dough before baking; Gray lines join the first dough replicate steps for each bread-making run.



Supplementary material S8: A) Plot of TTA according to yeast count (log<sub>10</sub> CFU/g); B) Plot of TTA according to LAB count (log<sub>10</sub> CFU/g); C) Plot of pH according to yeast count (log<sub>10</sub> CFU/g); D) Plot of pH according to LAB count (log<sub>10</sub> CFU/g).

Plots represented the dough samples 1 and were colored according to the bakery (B) and the bread-making (BMR) run : red= B1\_BMR1; magenta = B1\_BMR2; dark magenta = B2\_BMR1; yellow = B2\_BMR2; green = B3\_BMR1; orange = B3\_BMR2; pervenche = B4\_BMR1; brown = B4\_BMR2.

A) Significant decreasing linear relation between yeast count and pH was determined (p-value < 10<sup>-5</sup>, estimation: -0.30). B) In 3 of 8 cases, linear negative relation was determined between pH and LAB count within bread-making run. C) Significant increasing linear relation between yeast count and TTA was determined (p-value < 0.04, estimation: 2.12). D) Significant increasing linear relation between LAB count and TTA was determined (p-value < 0.05, estimation: 2.35).



Supplementary material S9: Plot of the LAB count according to the yeast count according to the bread-making run (BMR) for each bakery (B): red = B1\_BMR1; magenta = B1\_BMR2; dark magenta = B2\_BMR1; yellow = B2\_BMR2; green = B3\_BMR1; orange = B3\_BMR2; light blue = B4\_BMR1; brown = B 4\_BMR2; gray= B5\_BMR2.

## **Chapter 3:**

### **Pyrosequencing analysis of fungi communities in cereal-based fermented products**

*(In prep.)*

Charlotte Urien<sup>1</sup>, Pierre Montalent<sup>1</sup>, Judith Legrand<sup>2</sup> and Delphine Sicard<sup>3</sup>

<sup>1</sup> INRA, UMR 0320/UMR 8120 Génétique Végétale, F-91190 Gif-sur-Yvette, France.

<sup>2</sup> Univ Paris-Sud, UMR 0320/UMR 8120 Génétique Végétale, F-91190 Gif-sur-Yvette, France.

<sup>3</sup> INRA, UMR 1083 Sciences pour l'œnologie, 34060 Montpellier Cedex 2, France.

## Résumé

Les communautés microbiennes sont essentielles au maintien et au fonctionnement des écosystèmes, y compris dans des milieux tels que les produits fermentés. Depuis le développement des analyses de diversité par les méthodes dites de « séquençage nouvelle génération », la description des communautés microbiennes des produits alimentaires fermentés a largement porté sur les bactéries lactiques. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la description des populations de champignons d'un produit fermenté particulier : le levain de panification. Pour cela, deux techniques ont été utilisées : une méthode non culturale (le pyroséquençage d'amplicons de la région ITS1) et une méthode culturale pour l'identification des levures. La diversité spécifique de 14 levains, provenant de fournils répartis sur le territoire français, ainsi que d'un levain dit « synthétique » qui a servi de témoin positif pour le pyroséquençage a été analysée. L'analyse non-culturelle nous a mené à déterminer les amorces champignons-spécifiques adaptées à une matrice particulièrement riche en ADN de plantes et à compléter des bases de données de références publiques contenant la séquence ITS1 de champignons (UNITE et Uchime) avant l'assignation des séquences. Les résultats de l'assignation par les différentes bases de données de référence ont également été comparés. L'ajout de séquences aux bases de données a permis d'augmenter le pourcentage d'identification à l'espèce des séquences. La majeure partie des séquences provenant des levains naturels a été identifiée comme des *Saccharomycetales* et particulièrement des *Kazachstania*. Aucune espèce de *Saccharomycetales* n'est commune à l'ensemble des levains alors que cinq espèces d'autres champignons, principalement des pathogènes de plantes, le sont. Les résultats pour l'espèce dominante du levain sont comparables entre les deux méthodes mais le pyroséquençage offre une plus grande profondeur de description de la communauté fongique du levain. Cette étude met en évidence la composition fongique spécifique de chaque levain, l'importance de compléter les bases de données existantes ainsi que la prépondérance des espèces du genre *Kazachstania* dans les levains français produits à partir de farine issue de l'Agriculture Biologique.

**Mots clefs:** champignons, *Saccharomycetales*, analyse pyroséquençage, amélioration des bases de données de références, analyse culturale, diversité spécifique, *Kazachstania*

## Abstract

Microbial communities are essential for the maintenance and the functioning of the ecosystems including in fermented products. Since the development of diversity analysis by “new generation sequencing” approaches, food product microbial communities’ description was mainly done on lactic acid bacteria. In this study, we described fungal populations of a typical fermented product: the bread sourdough. Both non-cultural based (pyrosequencing of ITS1 amplicons) and cultural-based (for yeast identification only) methods were performed. Specific diversity of 14 sourdoughs from bakeries spread all over the French territory and of a synthetic sourdough used as positive control for pyrosequencing were analyzed. For the non-cultural based method, we determined fungal-specific primers adapted to the sourdough matrix particularly rich in plant DNA, we completed public reference databases including the ITS1 sequence of fungi only (UNITE and Uchime) before assigning the pyrosequencing sequences. Results of the assignment by the different databases were compared. Addition of our sequences in the databases increased species level identification of the sequences. The majority of the sourdoughs sequences were identified as *Saccharomycetales* and in particular as *Kazachstania* genus. No *Saccharomycetales* species were shared by all the sourdoughs whereas five other fungal species, mainly described as pathogen plants, were found in all the sourdoughs. Results for the dominant species identified in each sourdough were similar for both methods but pyrosequencing analysis allowed a deeper description of the fungal community. This study highlighted the particular fungal community of each sourdough, the necessity to complete commonly used reference databases and the dominance of the *Kazachstania* species in French organic bread sourdoughs.

**Keywords:** fungi, *Saccharomycetales*, pyrosequencing analysis, improvement of the reference databases, cultural-based analysis, specific diversity, *Kazachstania*



## 1. Introduction

The properties and dynamics of an ecosystem are primarily shaped by the community it hosts notably through interactions between different species. As microbes colonize all types of environments, including living organisms, they are part of the ecosystems and are necessary for the functioning of the ecosystems they belong to (Ganter 2006; Sul *et al.*, 2013; Wooley *et al.*, 2010). Microbial communities have been shown to affect ecosystems process rates (Reed & Martiny 2007 for review), and play different roles such as, enhancing decomposition (Wardle 1998; Swift *et al.*, 1979; Strickland *et al.*, 2009, Kachalkin *et al.*, 2012; Baldrian *et al.*, 2012), reducing the resources available for invasive species (Eisenhauer *et al.*, 2013) or changing the competitiveness between dominant and subordinate plant species (Mariotte *et al.*, 2013). In addition to their impact in natural environments, microbial communities play key roles in human domesticated environments, notably for the production of fermented food products such as dairy products (faisselle, cheese, kefir grains, yogurt, dahi, kumys in Russia), cereal and legume-based fermented foods (bread, Idli, Dosa, Soy foods), fermented plant root products (Gari and Fufu), fermented fruits and vegetables (sauerkraut, kimchi, pickled vegetables, olives), and fermented fish and meat products. The microbial communities found in these products include fermentative organisms such as lactic acid bacteria (LAB) and fungi, particularly yeast (Bourdichon *et al.*, 2012, for review). As the community composition of these products affects their organoleptic properties (texture, flavor, (Birch *et al.*, 2013; Csoma *et al.*, 2010; Damiani *et al.*, 1996; Hansen & Schieberle 2005; Martinez-Anaya *et al.*, 1990) and their preservation (Caplice & Fitzgerald 1999), it is important to characterize these communities. In addition, those ecosystems may represent good models to study interspecific interactions in microbial communities as they are hosting a limited number of species compared to many ecosystems such as plant or animal microbiomes. Fermented food product microbial communities have long been described by classical microbiology methods (culture-based methods) where a restricted number of cultivable clones are isolated after growth on different media: a part of the microbial population has been probably undetected. Yeasts for instance, defined as unicellular fungi (Brock & Madigan 1991), have been specifically studied and identified using cultivation-dependent methods in fermented products including grape must (for example Tristezza *et al.*, 2014), beer (for example Boulton et Quain 2008), kefir grains (for example Bai *et al.*, 2010), millet fermentation products (for example Pedersen *et al.*, 2012), fermented meat products (Encinas *et al.*, 2000; Mendonça *et al.*, 2013) and bread sourdough (for example (Vrancken *et al.*, 2010; Minervini *et al.*, 2012). More recently, non-culture based techniques, where no prior growth of the microbial organisms is needed, have been utilized to characterize microbial communities. Pyrosequencing approaches (culture-independent method with sequencing of a large amount of amplicons) on

fermented food products mainly focused on LAB species (Alegría *et al.*, 2012; Ercolini *et al.*, 2012; Humblot & Guyot 2009; Jeong *et al.*, 2013; Jeong *et al.*, 2013; Jung *et al.*, 2011; Jung *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2011; Kiyohara *et al.*, 2012; Koyanagi *et al.*, 2011; Leite *et al.*, 2012; Masoud *et al.*, 2011; Nam *et al.*, 2012; Nam *et al.*, 2012; Nam *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2012; Roh *et al.*, 2010; Sakamoto *et al.*, 2011) and rarely described fungal populations: in spontaneous cacao bean fermentation (Illegghems *et al.*, 2012) and in alcoholic beverage (Jung *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2011) only, where *Saccharomycetales* were mainly identified. Pyrosequencing of the Internal transcribed spacer (ITS), a non-translated part of the ribosomal DNA, is mainly used for fungi study. This region has been recognized as the primary fungal barcode marker (Schoch *et al.*, 2012). Ideal markers must be shared by all fungi, have the appropriate length to be sequenced, have high interspecific but low intraspecific variations and could be align across fungi (Lindahl *et al.*, 2013). Ribosomal DNA is a good choice for characterizing microbial communities because of its universality (Head *et al.*, 1998). In fungi, of the ribosomal DNA contains in order, the small subunit (SSU) 18S RNA, the internal transcribed spacer 1 (ITS1), the 5.8S RNA, the ITS2 spacer and the large subunit (LSU) regions (Martin & Rygiewicz 2005). Commonly used in mycological studies (Bridge *et al.*, 2005; Horton & Bruns 2001) the ITS region was recently described to have a better probability of successfully identifying fungi amplicons compared to the SSU and the LSU highly conserved regions (Boyanton *et al.*, 2008; Schoch *et al.*, 2012). The ITS region varies in length between species because of multiple introns (Seifert *et al.*, 2007; Vialle *et al.*, 2009), it, has high interspecific variability, both in length and sequence, because this region does not code for ribosomal components, but it also has low variability within a species (Gazis *et al.*, 2011; Schoch *et al.*, 2012). Amplification of either ITS1 or ITS2 was shown to be informative in describing microbial community composition (Ihrmark *et al.*, 2012), with each region yielding similar results (Bazzicalupo *et al.*, 2013; Mello *et al.*, 2011).

To our knowledge, no study has been performed to characterize fungal diversity in a matrix based on cereal and maintained by human over a period of years, such as bread sourdough. Bread sourdough is a complex matrix, containing significant amounts of plant DNA. To analyze fungi in sourdough by ITS pyrosequencing, one problem is that classical ITS primers amplify not only fungal but also wheat and rye DNA. Some ITS primers have already been described that amplify fungal, but not plant, ITS regions, for example, ITS1F (Gardes & Bruns 1993), and also a set of primers specific for the fungal group *Dikaryomycota* (Martin & Rygiewicz 2005). But these fungus-specific primers may discriminate against certain fungal taxa, for example the *Ascomycota* (Bellemain *et al.*, 2010; Ihrmark *et al.*, 2012). The choice of ITS primer pair can vary based on many factors, such as the DNA preparation method, the sequencing method, the length of the amplicon and the desired microbe groups that will be sampled.

The objective of this study was to develop a method to describe fungal diversity in fermented cereal-based products with the least amount of bias possible. In this present work we: i) describe a specific primer pair that amplifies the ITS1 region from fungi but not from plants; ii) complete and compare databases to assign sourdough's fungi Operational Taxonomic Units (OTUs); and iii) compare sourdough ITS pyrosequencing data with data obtained from a culture-based approach. Our methods were applied to study the pattern of species diversity among 14 natural sourdoughs collected in organic bakeries located across France.

## **2. Materials and methods**

### **2.1 Field survey and sourdough collection**

A total of 14 bakeries located in different French regions were selected, based on their choice to promote biodiversity conservation and to limit their ecological footprint through the use of natural sourdough and organic flour (Supplementary material 1). In each bakery, the final leavened dough of one bread making run was sampled. All samples were kept at 4 °C for three to seven hours or sent by mail and then kept cold before the culture-based analysis was initiated. Yeasts were first isolated and identified by the culture-based technique, with part of the sample kept at -20 °C for the non-culture based analysis.

### **2.2 Cultural-based method of yeast identification**

Yeast isolation, DNA extraction and yeast species identification were performed according to Lhomme *et al.* (accepted in Food Microbiology, Chapter 2). Yeast species were identified on the basis of three molecular markers: the species of 519 yeast isolates were identified on the basis of their pattern of *AluI* digestion of the amplified rDNA Non-Transcribed Spacer, *NTS2* (Nguyen & Gaillardin, 1997, Table 1), species identification was extended for 60 strains by sequencing the *D1/D2* rDNA region (Kurtzman & Robnett 2003, Table 1) and for 46 strains by sequencing the actin encoding gene, *ACT1* (Daniel & Meyer, 2003; Kan, 1993, Table 1). All the oligonucleotide PCR primers used were obtained from Invitrogen (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and Sanger sequenced on both strands.

DNA sequence alignments were carried out using the pairwise alignment method for the forward and reverse complement sequences of each strain in order to obtain a consensus sequence. Identification queries were fulfilled by a BLAST search of the National Center for Biotechnology Information database (NCBI, Bethesda, USA) and the YeastIP databases (<http://genome.jouy.inra.fr/yeastip/>). A similarity of more than 99 % to gene sequences of type strains was used as the criterion for species identification.

**Table 1:** Sequences of oligonucleotide primers used for PCR amplification and sequencing for culture-based identification

Primer set	Oligonucleotide sequence (5' --> 3')	Sequence length (bp)	Target gene	Reference
SR21 LR13	CTTAATCTTTGAGACAAGC CGATCTGCTGAGATTAAG	2540	intergenic spacer rDNA (NTS)	Nguyen <i>et al.</i> , 2009
NL1  NL4	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG  GGTCCGTGTTCAAGACGG	550	26S gene D1/D2 region ribosomal gene	O'Donnell, 1993
CA5R CA14	GTGAACAATGGATGGACCAGATTCGTCG AACTGGGATGACATGGAGAAGATCTGGC	800	<i>act1</i> gene	Kan, 1993
58A2R NSA3 NLC2	CTGCGTTCTTCATCGAT AAACTCTGTCGTGCTGGGGATA GAGCTGCATCCCAAACAATC	375-650  975-1250	Internal transcribed spacer (ITS1)  ITS1-5,8S-ITS2	Martin & Rygiewicz, 2005

## 2.3 Non-cultural based method of fungal identification

### 2.3.1 Synthetic sourdough

To test the non-culture based (pyrosequencing) identification technique, from DNA extraction through taxon assignment, we created a synthetic sourdough to use for control experiments. One representative strain (nine strains) of each species previously isolated from French organic sourdoughs (Lhomme *et al.*, accepted in Food Microbiology) was chosen as a positive control of the sequencing (synthetic sourdough in Table 3). After 12 hours in 5 mL of YE media at 30 °C, cell counts for each strain were determined using a Coulter counter (Beckman Coulter, Brea, CA USA). All strains were combined at the same density ( $10^7$  UFC/g of sourdough) with organic wheat flour (0.76 g, organic T110 wheat flour from Biocer) and distilled water (1 g qsp). This synthetic sourdough, containing the yeast strains, was then stored at -20 °C for 10 days to mimic the storage process for the cultures obtained from the bakeries.

### 2.3.2. Total DNA extraction

The PowerSoil DNA Isolation Kit (MO BIO laboratories, Inc, Carlsbad, CA USA) was used to extract total DNA of all the sourdough samples. The following changes were made to the kit protocol: after adding C1 solution to an aliquot of sourdough in the bead tubes, the tubes incubated at 65 °C for 10 minutes. Followed by horizontal mixing at 30 Hz for 5 minutes. The tubes were then put on ice before continuing with the kit protocol. The final elution step with C6 solution was carried out two successive steps with the addition of 40 µL (total 80 µL).

### 2.3.3. Amplicon preparation for pyrosequencing

#### Choice of primers

Pyrosequencing was carried out on the ITS1 rDNA region. Among the 29 ITS1 primers that were published in the literature, we have chosen the ITS primers that could specifically amplify fungal DNA but not plant DNA.

To do this, we first built a sequence database by blasting the S288C *Saccharomyces cerevisiae* ITS1-5.8S-ITS2 sequence against the NCBI non-redundant nucleotide database, using any sequences with both an e-value  $< 10^{-4}$  and  $> 80$  % identity. We also added *Poaceae* ITS sequences; together with the NCBI blast-obtained sequences there were 1995 sequences total in this database. Second, we blasted the literature primers (Table 2) on this database (parameters: e-value  $< 10^{-2}$ ;  $> 80$  % identity). From this analysis, six primers theoretically allowed amplification of fungal but not *Poaceae* ITS regions: forward primers NSI1 (Gardes & Bruns 1993) and NSA3 (Martin & Rygiewicz 2005), and reverse primers ITS4, NLB4 (Gardes & Bruns 1993), 58A2R and NLC2 (Martin & Rygiewicz 2005, Figure 1).

Two of these hypothetical fungal-specific primer pairs (NSA3-NLC2 and NSA3-58A2R) were tested on 17 natural sourdough yeast strains representing the nine species previously identified in natural French organic sourdoughs (Lhomme *et al.*, accepted in Food Microbiology) and on three plant species: wheat, maize and nigella (column labeled “primer test” in Table 3).

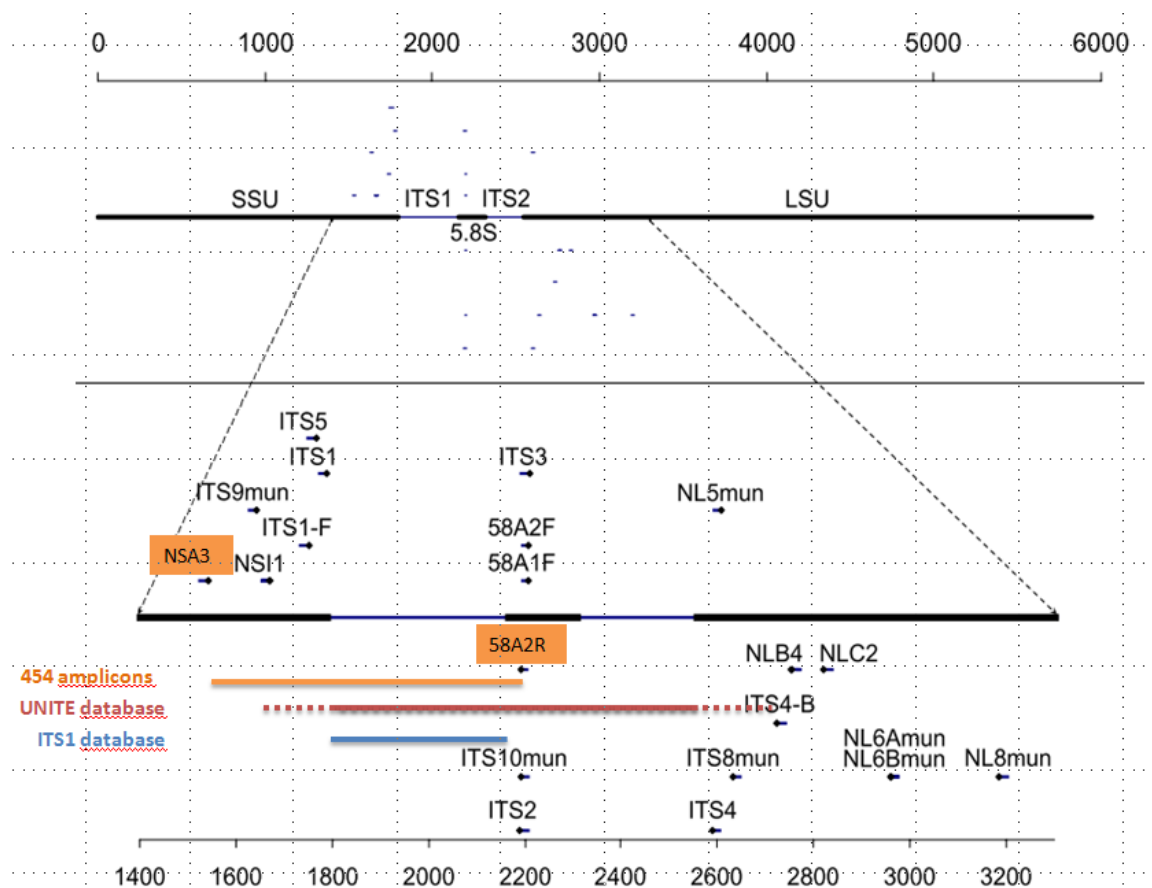
**Table 2:** Fungi ITS primers list, in 5' to 3'. “\_RC”= reverse complement.

Primer name	Primer sequence	Reference
ITS1F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	Orgiazzi <i>et al.</i> , 2013
ITS1-FL	CAAACCTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	Taylor <i>et al.</i> , 2008
ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC	Orgiazzi <i>et al.</i> , 2013
ITS5	TCCTCCGCTTATTGATATGC	Schoch <i>et al.</i> , 2012
ITS2r_RC	GCATCGATGAAGAACGCAGC	Orgiazzi <i>et al.</i> , 2013
ITS1F	CTTGGTCATTTAGAGGAACTAA	Gardes & Bruns, 1993
ITS5f_RC	CCTTGTTACGACTTTTACTTCC	Bellemain <i>et al.</i> , 2010
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	Bellemain <i>et al.</i> , 2010
ITS4r	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	Schoch <i>et al.</i> , 2012
ITS4Br_RC	CTGGACCGTGTACAAGTCTCTG	Bellemain <i>et al.</i> , 2010
ITS4r	TCCTCCGCTTATTGATATGC	Bellemain <i>et al.</i> , 2010
TW13r_RC	CGTCTTGAAACACGGACC	Taylor & Bruns, 1999
TW13-64Pr_RC	CGTCTTGAAACACGGACCAAAATGAACCACAAAGAAAC	Taylor <i>et al.</i> , 2008
TW13-67Pr_RC	CGTCTTGAAACACGGACCAAAATCGGCGGCTAAGAAAC	Taylor <i>et al.</i> , 2008
TW13-102Pr_RC	CGTCTTGAAACACGGACCAAAATAGTTACTAAAGAAAC	Taylor <i>et al.</i> , 2008
TW13-126Pr_RC	CGTCTTGAAACACGGACCAACAGTGCTATGAAGAAAC	Taylor <i>et al.</i> , 2008
TW14r	GCTATCTGAGGGAAACTTC	Taylor & Bruns, 1999
Ctb6f	GCATATCAATAAGCGGAGG	Taylor & Bruns, 1999
Ctb6f_RC	CCTCCGCTTATTGATATGC	Taylor & Bruns, 1999
ITS4r_RC	CCGTTCTTGTCTATGTTCTTG	Gardes & Bruns, 1993
NSI1	GATTGAATGGCTTAGTGAGC	Martin & Rygiewicz, 2005
58AIF	GCATCGATGAAGAACGC	Martin & Rygiewicz, 2005
58A2F	ATCGATGAAGAACGCAG	Martin & Rygiewicz, 2005
NLB4_RC	GTCATAGAGGGTGAGAATCC	Martin & Rygiewicz, 2005
58A2R	CTGCGTTCTTCATCGAT	Martin & Rygiewicz, 2005
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	Kurtzman & Robnett, 2003
ITS4_RC	GCATATCAATAAGCGGAGGA	Kurtzman & Robnett, 2003
NLC2	GAGCTGCATTCCCAACAACCTC	Martin & Rygiewicz, 2005
NSA3	AAACTCTGCTGCTGGGGATA	Martin & Rygiewicz, 2005

**Table 3:** List of strains used: “primer test” = strains tested to choose primers, “reference” = strains which had their ITS1 region amplified and used as reference sequences, “synthetic sourdough” = strains used to build synthetic sourdough, “nr ni” = reference sequences Sanger sequenced and added to the databases. (X) = with “UNITE completed” database only. “ID” = strain identifier: Bi=Baker ID ; r=sample done during a second bread-making process, TP= final leavened dough sample, AC= dough before baking sample.

strain name	ID	primer test	reference	synthetic sourdough	nr ni
<i>Zea mays</i> « B73 » line	maïs	x			
<i>Triticum aestivum</i> « courtot » variety	blé	x			
<i>Nigella damascena</i>	nigelle	x			
<i>Candida carpophila</i>	B1_TP_21	x	x	x	x
<i>Candida humilis</i>	B5r_TP1_1	x	x	x	x
<i>Candida humilis</i>	B5r_TP1_13	x	x		
<i>Hyphopichia Pseudoburtonii</i>	B1_TP_40	x	x	x	x
<i>Hyphopichia Pseudoburtonii</i>	CBS_2455a	x			
<i>Kazachstania bulderi</i>	B3_LC1_1	x	x		
<i>Kazachstania bulderi</i>	B3_TP1_1	x	x	x	
<i>Kazachstania exigua</i>	B2r_TP1_13	x	x		
<i>Kazachstania exigua</i>	B1r_TP1_1	x	x	x	x
<i>Kazachstania unispora</i>	B2_AC_10	x	x	x	
<i>Kazachstania unispora</i>	B2r_TP1_1	x	x		x
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	B2_AC_31	x	x		
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	B2_AC_37	x	x		x
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	B2_AC_33			x	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	B1r_TP1_33	x	x	x	x
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	B5r_TP2_12	x	x		
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	B1_LC_1	x	x	x	
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	B1_AC_26	x	x		
<i>Candida carpophila</i>	CLIB1330 <sup>T</sup>		x		x
<i>Candida glabrata</i>	CLIB298 <sup>T</sup>		x		x
<i>Candida humilis</i>	CLIB1323T		x		x
<i>Candida parapsilosis</i>	CLIB214		x		x
<i>Candida tropicalis</i>	CLIB315		x		x
<i>Hyphopichia burtonii</i>	CBS2352		x		x
<i>Kazachstania barnettii</i>	CLIB433		x		
<i>Kazachstania bulderi</i>	CLIB596		x		x
<i>Kazachstania exigua</i>	CLIB179		x		x
<i>Kazachstania unispora</i>	CLIB234		x		
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	CLIB515		x		x
<i>Millerozyma farinosa</i>	CLIB517		x		x
<i>Pichi kudriavzevii</i>	CLIB884		x		x
<i>Pichia occidentalis</i>	CBS5459		x		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CLIB227		x		(x)
<i>Scheffersomyces stipitis</i>	CLIB187		x		x
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	CLIB230		x		x
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	CLIB284		x		x

The ITS region was amplified in 50 µL using the same conditions as for amplification of the NTS region. One of the two primer pairs gave fungus specific amplification and was selected for ITS pyrosequencing: NSA3 (5'-AAACTCTGTCGTGCTGGGGATA-3') and 58A2R (5'-CTGCGTTCTTCATCGAT-3') (Martin et Rygiewicz 2005, Table 1, Figure 1). After amplification, the sequences were aligned and only polymorphic sequences were conserved for the rest of the study.



**Figure 1:** Diagram of primer locations in the ribosomal cassette consisting of SSU, ITS1, 5.8S, ITS2 and LSU rDNA (according to Martin & Rygiewicz 2005). Primers are positioned above (forward primers) or below (reverse) their sequence positions. ITS1, ITS2, ITS3 and ITS4 from White *et al.* 1990; primers ITS8mun, ITS10mun, NL5mun, NL6A, NL6B, NL8A from Egger 1995; primers ITS1-F, ITS4-B from Gardes & Bruns 1993 and the remaining primers (NSA3, NS11, 58A1F, 58A2F, 58A2R, NLB4 and NLC2 from Martin & Rygiewicz 2005. Scale is in base pairs according to the extension of the Gargas & DePriest 1996, nomenclature system described Martin & Rygiewicz 2005. In orange: size and position of the 454 pyrosequencing amplicons of this study; in red: size and position of the sequences of the 97 % UNITE database; in blue: size and position of the sequences of the ITS1 database.



In addition to the 17 strains described above that were used to test primer pairs, we also amplified one strain of each yeast species that has been identified in sourdough according to the literature; we acquired these strains from CIRM strain collection. For each of these 34 strains, the ITS1 region was recovered and amplified with the chosen primers NSA3-58A2R (column “reference”, Table 3). PCR products were Sanger sequenced on both strands (Genoscreen, Lille, France). Consensus sequences for each strain were used as reference sequence in the rest of this study.

### **Amplicon preparation**

Amplicons for pyrosequencing were prepared in two steps: ITS1 amplification and ITS1 amplification with barcode addition. ITS1 region was amplified from 100-200 ng of total sourdough DNA incubated in a 50 µL of the following mix reaction: 10 mM of each dNTP, 1 mM of MgCl<sub>2</sub>, 15 µM of each primer, 2.6 U of Taq Roche Expand High Fidelity (Roche, Mannheim, Germany), 1 X Roche Expand High Fidelity buffer. Two consecutive amplification regimes were performed for this first ITS1 amplification step. After an initial denaturation at 95 °C for 2 minutes, 10 cycles of amplification were conducted as follows: denaturation at 95 °C for 15 seconds, annealing at 60 °C for 30 seconds, and extension at 72 °C for 45 seconds. The final extension was at 72 °C for 45 seconds. A second 10 cycles of amplification was performed: denaturation at 95 °C for 15 seconds, annealing at 60 °C for 30 seconds, and extension at 72 °C for 45 seconds with addition of 5 seconds extension time at each subsequent cycle. The final extension was at 72 °C for 7minutes.

Addition of specific barcodes was performed in 50 µL reactions containing 2 µL of the previous PCR product, 0.2 mM of each dNTP, 0.5 mM of MgCl<sub>2</sub>, 0.3 µM of each specific primer containing the specific barcode and the Eurofins MID (Table 4), 2.6U de Taq Expand High Fidelity of Roche and 1X Buffer Expand High Fidelity. After an initial denaturation at 95 °C for 2 minutes, 5 cycles of amplification were conducted as follows: denaturation at 95 °C for 15 seconds, annealing at 60 °C for 30 seconds, and extension at 72 °C for 45 seconds. The final extension was at 72 °C for 7minutes.

**Table 4:** Barcode sequence for each sample (SD: sourdough)

Sample ID	Nucleic Acid	barcode seq.
SD_1	70,2	ACGAGTGCGT
SD_2	61,7	ACGCTCGACA
SD_3	66,8	AGACGCACTC
SD_4	68,6	AGCACTGTAG
SD_5	55,2	ATCAGACACG
SD_6	59,6	ATATCGCGAG
SD_7	58,7	CGTGTCTCTA
SD_8	60	CTCGCGTGTC
SD_9	56,9	TCTCTATGCG
SD_10	65,4	TGATACGTCT
SD_11	59	CATAGTAGTG
SD_12	56,4	CGAGAGATAC
SD_13	60,6	ATACGACGTA
SD_14	58,8	TCACGTACTA
SD_15	52,9	CGTCTAGTAC

Each sample was column purified with the MinElute PCR Purification Kit (Qiagen, 28006), followed by concentration with a speed vacuum (Savant SPD IIIV Speed Vac Concentrator, Thermo Electron Corporation) for 20 min to obtain 60ng/μL as measured by Nanodrop (Nanodrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer, Thermo Scientific). Finally, amplicons were sent to Eurofins (<http://www.eurofins.com/en.aspx>) for the titanium FLX pyrosequencing (Roche technology, compared with other new-generation sequencing systems in Liu *et al.*, 2012).

#### **2.3.4 Pyrosequencing data analysis**

The pyrosequencing data were processed with the QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) version 1.8.0 (Caporaso *et al.*, 2010) pipeline.

##### **Filtering, quality trimming and clustering into OTU**

To conserve high quality sequences only, we trimmed and filtered the reads. For filtering, raw pyrosequencing *fna* and quality files were transformed to fastq file before demultiplexing, quality filtering and analysis with QIIME. Reads were truncated with PRINSEQ tool at the 3' position at the quality threshold of 34 (represents a 1 in 4,000 chance of an incorrect base call) and any read of < 127 bp were discarded. Operational taxonomic units (OTUs) were built using QIIME's uclust-based (Edgar, 2010) open reference OTU-picking workflow, with a threshold of 99 % pairwise identity.

The OTUs were classified taxonomically using a QIIME-based wrapper of the Ribosomal Database Project (RDP) classifier (Wang *et al.* 2007). We assigned OTUs at different taxonomic levels: kingdom, phylum, class, order, family, genus and species on the most representative sequence of each OTU. Databases containing ITS1 sequences from fungi exclusively were chosen:

- UNITE fungal ITS database version 6 (17,253 sequences; downloadable at [http://unite.ut.ee/sh\\_files/sh\\_qiime\\_release\\_13.05.2014.zip](http://unite.ut.ee/sh_files/sh_qiime_release_13.05.2014.zip)), renamed “UNITE only” database. This is the non-redundant UNITE+INSDC fungal ITS database as presented in Kõljalg *et al.* (2013) with representative/reference sequences of all species hypothesis (SHs) after 97 % similarity.
- UCHIME database from UNITE (20,994 sequences), renamed “ITS1 only” database. It is supposed to contain exclusively ITS1 sequences thanks to ITSx software (Bengtsson-Palme *et al.*, 2013, database downloadable at [http://unite.ut.ee/sh\\_files/uchime\\_reference\\_dataset\\_26.07.2014.zip](http://unite.ut.ee/sh_files/uchime_reference_dataset_26.07.2014.zip)).

Those two databases were completed with ITS1 sequences obtained from seven sourdough and 15 (14 for “ITS1 completed” database) CIRM strains sequences previously amplified and Sanger sequenced (Table 3, column nr ni) corresponding to 18 previously described sourdough species. Nine of these species were not represented in at least one database (Table 5). Those additional sequences were non redundant and not included with the “UNITE only” database sequences.

**Table 5:** Representation of the yeast species found in bread sourdoughs in ITS1 and UNITE databases

species name	reference sequence in ITS1 db	reference sequence in UNITE db
<i>Candida carpophila</i>		
<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>   HQ014730   SH235343.06FU   reps	<i>Candida glabrata</i>   SH031506.06FU_JN942642_reps
	<i>Candida glabrata</i>   JN675310   SH235344.06FU   reps	<i>Candida glabrata</i>   SH033581.06FU_HQ014730_reps
	<i>Candida glabrata</i>   JN942642   SH232702.06FU   reps	<i>Candida glabrata</i>   SH033582.06FU_JN675310_reps
<i>Candida humilis</i>	<i>Candida humilis</i>   AY046174   SH232406.06FU   reps	<i>Candida humilis</i>   SH031257.06FU_DQ104399_reps
<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>   JN675330   SH223248.06FU   reps	<i>Candida parapsilosis</i>   SH024393.06FU_JN942630_reps
	<i>Candida parapsilosis</i>   JN942630   SH223486.06FU   reps	
<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>   AY725426   SH214552.06FU   reps	<i>Candida tropicalis</i>   SH017650.06FU_AY725426_reps
	<i>Candida tropicalis</i>   EF568042   SH195489.06FU   refs	
	<i>Candida tropicalis</i>   HQ014732   SH195497.06FU   reps	
	<i>Candida tropicalis</i>   JN942634   SH195492.06FU   reps	
<i>Hyphopichia pseudoburtonii</i>		
<i>Kazachstania barnettii</i>	<i>Kazachstania barnettii</i>   AY046173   SH200639.06FU   reps	<i>Kazachstania barnettii</i>   SH007799.06FU_AY046173_reps
<i>Kazachstania bulderi</i>	<i>Saccharomyces bulderi</i>   AY046172   SH227779.06FU   reps	
<i>Kazachstania exigua</i>	<i>Kazachstania exigua</i>   AY046170   SH227777.06FU   reps	<i>Kazachstania exigua</i>   SH027629.06FU_AY046170_reps
<i>Kazachstania unispora</i>	<i>Kazachstania unispora</i>   EU794732   SH207124.06FU   reps	
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	<i>Lodderomyces elongisporus</i>   HQ876042   SH230754.06FU   refs	<i>Lodderomyces elongisporus</i>   SH030023.06FU_KC408999_reps
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>   EF568003   SH117961.06FU   refs	
	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>   JN942638   SH216778.06FU   reps	
	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>   JQ766526   SH216781.06FU   refs	
<i>Millerozyma farinosa</i>	<i>Millerozyma farinosa</i>   EF568067   SH218660.06FU   refs	
<i>Pichia kudriavzevii</i>		
<i>Pichia occidentalis</i>		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>   AB018043   SH241331.06FU   refs	
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>   AJ544247   SH241333.06FU   refs	
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>   KC515359   SH241334.06FU   refs	
<i>Schafferomyces stipitis</i>		
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	<i>Torulaspora delbrueckii</i>   EF568083   SH238406.06FU   refs	<i>Torulaspora delbrueckii</i>   SH035946.06FU_KF057731_reps
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>   DQ249196   SH236922.06FU   refs	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>   SH034828.06FU_GQ466356_reps
	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>   GQ466356   SH236928.06FU   refs	
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>   AF444541   SH228918.06FU   refs	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>   SH028550.06FU_AF444541_refs

Assignment was performed on the most representative sequence of each OTU with the use of four databases separately:

- “UNITE only” database;
- “ITS1 only” database;
- “UNITE completed” database (17,275 sequences), corresponding to the “UNITE only” database completed with the 22 non redundant and non included sequences previously described (Table 3, column nr ni) and cut into the SSU region at the sequence CGTAAGGT (supplementary material 2) to do not bias assignment in favor of the SSU region well conserved between species;
- “ITS1 completed” database (21,015 sequences), corresponding to the “ITS1 only” database completed with 21 non-redundant and non included sequences of the yeast species already found in sourdough (Table 3, column nr ni, supplementary material 3, sequence shorter than 80bp was deleted) previously submitted to the ITSx software ([microbiology.se/sw/ITSx\\_1.0.9.tar.gz](http://microbiology.se/sw/ITSx_1.0.9.tar.gz)) to retain ITS1 region only.

Overall, the number of sequences belonging to different fungal taxa is presented Table 6 for the UNITE and ITS1 completed databases: they contain 416 and 501 *Saccharomycetes* reference sequences respectively.

**Table 6:** Number of species represented by origin of the reference sequences in the completed databases.

Taxonomic rank	taxa name	ITS1 completed	UNITE completed
phylum	<i>Basidiomycota</i>	9244	7973
	<i>Chytriomycota</i>	148	141
	<i>Glomeromycota</i>	675	487
	<i>Incertae_sedis</i>	6	7
	<i>Microsporidia</i>	0	12
	<i>Neocallimastigomycota</i>	1	0
	unidentified	739	457
	<i>Zygomycota</i>	460	365
	<b><i>Ascomycota</i></b>	<b>9742</b>	<b>7833</b>
Class (of the <i>Ascomycota</i> phylum)	<i>Archaeorhizomycetes</i>	58	61
	<i>Arthoniomycetes</i>	79	60
	<i>Dothideomycetes</i>	1659	1192
	<i>Eurotiomycetes</i>	1095	840
	<i>Incertae_sedis</i>	164	114
	<i>Lecanoromycetes</i>	1483	1249
	<i>Leotiomycetes</i>	1097	825
	<i>Neoelectomycetes</i>	3	3
	<i>Orbiliomycetes</i>	59	62
	<i>Pezizomycetes</i>	724	671
	<i>Pneumocystidomycetes</i>	3	2
	<i>Sordiomycetes</i>	2614	1921
	<i>Schizosaccharomycetes</i>	1	1
	<i>Taphrinomycetes</i>	23	26
	unidentified	178	389
	<i>Xylonomycetes</i>	1	1
	<b><i>Saccharomycetes</i></b>	<b>501</b>	<b>416</b>
Family (Saccharomycetales Order)	ND	7	1
	<i>Debaryomycetaceae</i>	14	4
	<i>Dipodascaceae</i>	13	10
	<i>Eremotheciaceae</i>	4	4
	<i>Incertae_sedis</i>	256	200
	<i>Lipomycetaceae</i>	15	11
	<i>Metschnikowiaceae</i>	11	11
	<i>Pichiaceae</i>	56	41
	<i>Saccharomycetaceae</i>	79	66
	<i>Saccharomycodaceae</i>	14	9
	<i>Saccharomycopsidaceae</i>	6	4
	<i>Trichomonascaceae</i>	18	15
	unidentified	8	41

### Sensitivity and specificity of the databases

To test the performance of the assignment on with each database with RDP classifier method, we sampled two random set of sequences of 143 and 200 sequences drawn respectively from UNITE and ITS1 completed databases. We assigned these random set of sequences using the UNITE and ITS1 completed databases respectively. Sensitivity, capacity to detect an assignment at the species' level, was calculated as follow:  $Se = \frac{TP}{(TP+FN)}$

where *Se* is the sensitivity, *TP* is the number of true positives (number of sequences attended to be assigned to the species rank and assigned to the species rank, to the good species), *FN* is the number

of false negatives (number of sequences attended to be assigned at to the species rank and not assigned to the species rank or to the good species).

Specificity, capacity to detect true assignment on the assignment detected to the species level, was calculated as follow:  $Sp = \frac{TP}{TP+FP}$

where  $Sp$  is the specificity;  $TP$  is the number of true positives,  $FP$  is the number of false positives (number of sequences assigned to the species rank and not assigned to the good species) (Degroeve *et al.*, 2005).

The fungi diversity was analyzed within (alpha diversity) and-between sourdoughs (beta diversity). We have considered both the number and abundance of species. We have estimated the abundance of each species as the number of reads in each of the OTUs assigned to this species. To perform rarefaction, jackknife and bootstrap analyses, the OTU table has been subsampled (rarefied) with the maximum sequences number of the sample containing the fewest number of sequences (7,300). The pseudo-random number generator used for rarefaction is an implementation of the Mersenne twister pseudorandom number generator (Matsumoto & Nishimura 1998). Observed species, Chao1, Shannon and Simpson rarefaction measures were performed (rarefaction curves were presented in Supplementary material 4). Beta diversity, between-sample community dissimilarity was estimated using weighted UniFrac distance (Lozupone & Knight 2005).

### **3. Results**

#### **3.1 Identification of yeast species in sourdough by culture-based method**

The *AluI* digestions of the *NTS2* region were amplified on the 519 yeast strains isolated from the 14 natural organic sourdoughs. Seven yeast species were identified corresponding to seven *AluI* digestion patterns. Strain identifications of sourdough 14 were non-reproducible so we do not present results for this sample. Among the whole sample (sourdough 1 to sourdough 13, corresponding to 519 strains, Table 7), 45.9 % of the identified yeast species belonged to *C. humilis*, 22.9 % were *Kazachstania bulderi*, and the remaining species were *Kazachstania exigua* (9.6 %), *S. cerevisiae* (8.1 %), *Kazachstania barnettii* (7.7 %), *Kazachstania unispora* (5.6 %) and *Candida carpophila* (0.2 %, Table 7). No species set of yeast species was shared between all the bakeries. *Kazachstania bulderi* and *Kazachstania barnettii* were identified as the only species present in three (sourdoughs 3, 4 and 12) and one (sourdough 13) natural sourdoughs respectively. *Candida humilis* was identified the only species present in four sourdoughs (sourdoughs 5, 6, 10 and 11), and as the dominant species in two sourdoughs: sourdough 7 where *S. cerevisiae* was also isolated and

sourdough 8 where *C. carpophila* was also isolated. *S. cerevisiae* was identified as the sole species in one other sourdough (sourdough 9) and as the minor species (one isolate) in sourdough 1 where *Kazachstania exigua* was the dominant species. Finally, *Kazachstania unispora* was isolated as the major species with the minor species *Kazachstania exigua* in sourdough 2.

Note that overall, only 42 (from sourdoughs 1, 7 and 9) out of 519 isolates belonged to the *S. cerevisiae* species, usually used as a leavening agent in bakery products.

**Table 7:** Species counts and frequencies into 13 of the 14 natural sourdoughs. Baker ID = baker identifier

species name \ baker ID	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	total per species	frequency
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1						1		40					42	0,081
<i>Kazachstania unispora</i>		29												29	0,056
<i>Kazachstania exigua</i>	39	11												50	0,096
<i>Kazachstania bulderi</i>			40	40								39		119	0,229
<i>Kazachstania barnettii</i>													40	40	0,077
<i>Candida humilis</i>					40	40	39	39		40	40			238	0,459
<i>Candida carpophila</i>								1						1	0,002
total per sourdough	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	39	40	519	

### 3.2. Identification of sourdough fungi by non-culture based pyrosequencing analysis

A total of 206,186 pyrosequencing reads (mean length 430.35, ranging from 127 and 547 bp) were clustered in 2,986 OTUs with > 99 % identity. Each sample contains between 7,371 (sourdough 9) to 19,743 (sourdough 6) reads (Table 8). Seven hundred and eighty-eight OTUs corresponding to 202,689 reads were selected for analysis because they were represented by five or more reads. Each sample contains between 121 (sourdough 10) to 412 (sourdough 7) OTUs (Table 8).

**Table 8:** Total number of reads per sourdough, number of reads and OTUs per sourdough when more than five reads belonged to the out

sample	total read count	read count >5	OTU count >5
Sourdough 1	13795	13614	172
Sourdough 2	11909	11669	235
Sourdough 3	12499	12229	302
Sourdough 4	13800	13491	358
Sourdough 5	11113	11036	181
Sourdough 6	19743	19594	163
Sourdough 7	18758	18327	412
Sourdough 8	17173	16941	366
Sourdough 9	7371	7242	225
Sourdough 10	13831	13739	121
Sourdough 11	13399	13234	178
Sourdough 12	13362	13129	307
Sourdough 13	15960	15735	228
Sourdough 14	13149	12773	263
Synthetic sourdough (sourdough 15)	10324	9936	358
total	206186	202689	

### 3.3. Evaluation of the assignment databases

#### 3.3.1 Comparison of the OTU assignments with each database

To choose the most appropriate assignment database, we compared OTUs assignment results for four different databases: “UNITE only” (UNITE+INSD database), “UNITE completed” (UNITE+INSD database completed with 22 sequences of sourdough yeast strains), “ITS1 only” (Uchime database) and “ITS1 completed” (Uchime database completed with 22 sequences of sourdough yeast strains). Assignments to the same rank were quite similar regardless of the databases: only 42 OTUs (corresponding to 7.5 % of the assigned reads) were assigned differently depending on the database (supplementary material 5 & 6). Differences between assignments were mainly due to the lack of reference sequences in the original database: in both “UNITE only” and “ITS1 only” (for 19 cases) or in “UNITE only” (for seven cases), imprecision in UNITE nomenclature (for four OTUs), redundancy in the ITS1 databases (for four OTUs) or a longer sequence than the ITS1 region in the databases (in one case). “ITS1 only” database was not always restricted to the ITS1 region: when ITSx software was applied, seven sequences containing more than the ITS1 region were found (Supplementary material 5 & 6). In addition, the ITSx software did not cut our sequences at the same nucleotides as the one present in the ITS1 only database (example in supplementary material 7). The reason for conflicting



assignment remained unsolved for three OTUs assignments. Moreover, addition of our reference sequences in databases allows assigning to *K. exigua* and *C. carpophila* (for “UNITE completed” only) species. We choose to compare only the “completed” databases for their sensitivity and specificity.

To evaluate and compare the “ITS1 completed” and “UNITE completed” databases, evaluation of the forecast quality was done from assignment of two random sets containing 143 and 200 sequences, respectively, picked up in each completed database (list of the sequences of each random set in Supplementary material 8). The proportions of true positives on the entire possible assignments (sensitivity) and on the entire detected assignments (specificity) were calculated for each set of random picked up sequences assigned with “UNITE completed” and “ITS1 completed” databases (Table 9). The sensitivity and specificity were also summed for each completed database.

**Table 9:** sensitivity and specificity measures (in percent) of two random set of sequences on the UNITE and ITS1 completed databases.

Database\random sequences	measures	ITS1_random	UNITE_random	total
ITS1_completed	sensitivity	96	84	88.9
	specificity	100	94	96.8
UNITE_completed	sensitivity	70	100	87.5
	specificity	93,46	100	97.7

The ITS1 completed database presents a stronger capacity to assign OTU compare to UNITE (sensitivity: 88.9 versus 87.5, respectively). The “UNITE completed” database is more efficient to assign at the good taxa than ITS1 (specificity: 97.7 versus 96.8, respectively).

All the species added in the synthetic sourdough were identified with “UNITE completed” database unlike with “ITS1 completed” database.

### 3.3.2 Comparison of the assignment of each sourdough OTUs

The *Saccharomycetales* sequence assignments (64 % of the total assigned reads) were compared when using the “UNITE completed” and “ITS1 completed” databases (Table 10). OTUs were assigned to ten *Saccharomycetales* species with the “ITS1 completed” database and 12 species with the “UNITE completed” database, representing 55 % of the total assigned reads (54 % of the reads obtained from the ½ pyrosequencing run). The synthetic sourdough (sourdough 15) was made with eight *Saccharomycetales* species: *C. humilis*, *K. exigua*, *S. cerevisiae*, *K. unispora*, *K. bulderi*, *T.*

*delbrueckii*, *C. carpophila* and *H. pseudoburtonii*. The "UNITE completed" database allowed distinguishing all those species unlike the "ITS1 completed" database, which missed *Hyphopichia burtonii* and *Candida carpophila*. All the dominant *Saccharomycetales* reads corresponded to OTUs assigned to the same species with the two databases. In addition, the "UNITE completed" database allowed to assign OTUs to *Hyphopichia pseudoburtonii*, *Candida carpophila* and *Debaryomyces prosopodis* species whereas "ITS1 completed" database allowed to assign OTUs to *K. servazii* and assigned more OTUs to the *S. cerevisiae* species (2,132 with "ITS1 completed" database, 1,901 with "UNITE completed" database). The dominant sourdough 6's OTU (corresponding to the *denovo* 2,912 representing sequence) was assigned with both "UNITE only" and "ITS1 only" databases as *C. humilis* (data not shown).

UNITE fungal database (= "UNITE only") was commonly used as reference database for pyrosequencing data. Because the "UNITE completed" database showed a higher specificity than the "ITS1 completed" database and allowed identifying all the species known to be present in the synthetic sourdough we choose the "UNITE completed" database to assign OTUs.

**Table 10:** *Saccharomycetales* sequences number per sourdough according to the UNITE (grey) and ITS1 (white) completed databases. SD = sourdough; SD\_15= synthetic sourdough

			SD 14		SD 15		SD 9		SD 4		SD 7		SD 2		SD 3		SD 12		SD 5		SD 11		SD 1		SD 13		SD 8		SD 10		SD 6			
Family	Genus	Species rank\ database	UNITEc	ITS1c	UNITEc	ITS1c	UNITEc	ITS1c	UNITEc	ITS1c	UNITEc	ITS1c	UNITEc	ITS1c	UNITEc	ITS1c	UNITEc	ITS1c	UNITEc	ITS1c	UNITEc	ITS1c	UNITEc	ITS1c	UNITEc	ITS1c	UNITEc	ITS1c	UNITEc	ITS1c	UNITEc	ITS1c		
		<i>Saccharomycetales</i> ND	0	0	1	7	2	2	0	0	8	2	26	25	0	0	17	17	0	0	298	1	0	0	0	0	179	185	0	0	17976	17707		
<i>Saccharomycetaceae</i>		<i>Saccharomycetaceae</i> ND	0	0	0	1	0	0	0	66	0	0	0	0	0	129	0	130	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0		
	<i>Kazachstania</i>	<i>Candida humilis</i>	0	0	290	290	3	3	24	24	5431	5431	61	62	11	11	52	52	9762	9762	10496	10794	25	25	0	0	12043	12050	13512	13512	17	287		
		<i>Kazachstania aerobia</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	23	0	0	0	0		
		<i>Kazachstania</i> ND	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
		<i>Kazachstania servazzii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	23	0	0	0		
		<i>Kazachstania barnettii</i>	0	0	0	0	35	35	0	0	0	0	0	0	1	1	13	13	119	119	0	0	2	2	12447	12447	165	165	1	1	0	0	0	
		<i>Kazachstania bulderi</i>	0	0	221	220	1	1	4993	4927	1	1	1	1	9515	9386	9740	9610	0	0	4	4	0	0	0	0	294	288	0	0	0	0	0	0
		<i>Kazachstania exigua</i>	0	0	52	52	0	0	0	0	1	1	1348	1348	0	0	19	19	0	0	1	1	11734	11734	0	0	121	121	0	0	0	0	0	0
		<i>Kazachstania unispora</i>	0	0	18	18	0	0	0	0	2	2	5690	5659	0	0	6	6	0	0	0	0	1	1	0	0	59	59	0	0	0	0	0	0
		<i>Saccharomyces</i>	<i>Saccharomyces</i> ND	0	0	38	0	132	0	0	0	1	0	0	0	3	0	0	0	16	0	3	0	7	0	0	0	8	0	23	0	0	0	0
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		0	0	49	87	1715	1847	0	0	0	1	0	0	0	3	6	6	40	56	5	8	20	27	1	1	42	50	23	46	0	0	0	0
<i>Torulaspora</i>	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	0	0	16	16	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	16	16	1	1	0	0	0	0	0	0	
<i>Debaryomycetaceae</i>	<i>Debaryomyces</i>	<i>Debaryomyces</i> ND	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0		
		<i>Debaryomyces prosopidis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
	<i>Pichia/Hyphopichia</i>	<i>Pichia burtonii</i>	35	35	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
		<i>Hyphopichia pseudoburtonii</i>	2	0	280	0	5	0	0	0	1	0	0	0	0	0	3	0	0	0	2	0	0	0	7	0	9	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Kurtzmaniella</i>	<i>Candida railenensis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Meyerozyma</i>	<i>Candida carpophila</i>	0	0	6	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	1	0	0
		Total read count assigned per sample	37	35	971	691	1893	1888	5017	5017	5452	5451	7127	7127	9530	9530	9856	9853	9937	9937	10810	10808	11790	11790	12472	12465	12936	12927	13582	13582	17994	17994		
		Proportion of assigned reads	0,3	0,3	9,4	6,7	25,7	25,6	36,4	36,4	29,1	29,1	59,8	59,8	76,2	76,2	73,8	73,7	89,4	89,4	80,7	80,7	85,5	85,5	78,1	78,1	75,3	75,3	98,2	98,2	91,1	91,1		

### 3.4. Sourdough fungal composition described by non-culture based analysis

In this part, we present the result of the assignment with “UNITE completed” database, for the OTUs represented by more than five reads over the all 15 sourdoughs. Mainly (98 %) reads were assigned to *Ascomycota* (Table 11).

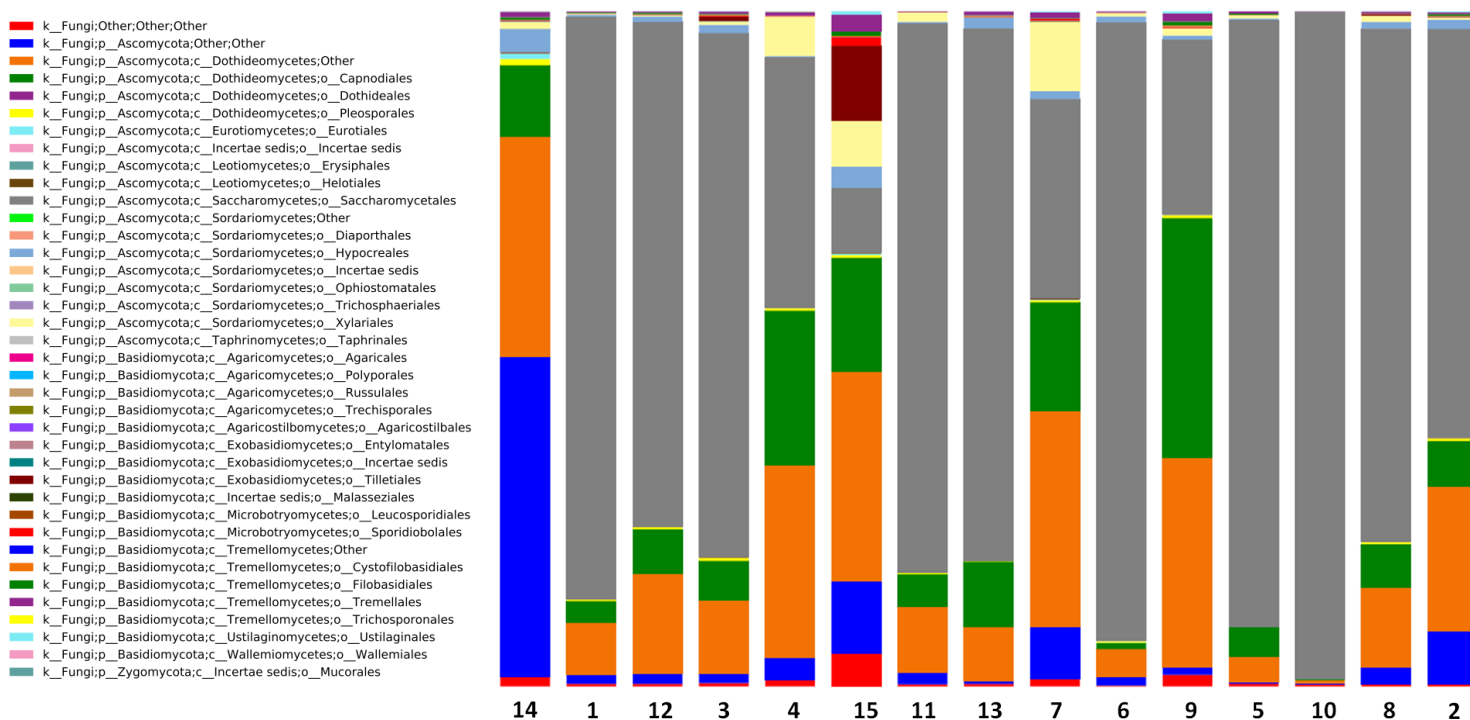
**Table 11:** Major identified taxa in the all sample. () = percentage of reads assigned to each taxa.

Phylum	Class	Order	Family	Genus
<i>Ascomycota</i> (98%)	<i>Saccharomycetes</i> (63%)	<i>Saccharomycetales</i> (63%)	<i>Incertae sedis</i> (34%)	" <i>Candida</i> " (34%)
			<i>Saccharomycetaceae</i> (29%)	<i>Kazachstania</i> (28%)
				<i>Saccharomyces</i> (1%)
	<i>Sordariomycetes</i> (3%)	<i>Hypocreales</i> (1%)	<i>Clavicipitaceae</i> (1%)	<i>Claviceps</i> (1%)
			<i>Nectriaceae</i> (1%)	<i>Fusarium</i> (1%)
		<i>Xylariales</i> (2%)	<i>Incertae sedis</i> (2%)	<i>Monographella</i> (2%)
<i>Basidiomycota</i> (2%)	<i>Exobasidiomycetes</i> (1%)	<i>Tilletiales</i> (1%)	<i>Tilletiaceae</i> (1%)	<i>Tilletia</i> (1%)

#### 3.4.1 Assignment to the order level

##### Natural sourdoughs

Undefined *Dothideomycetes* represented 15 % (163 OTUs; 28,768 reads) of the reads assigned along the natural sourdoughs. Zero to 33 % of the assigned reads of each sourdough were identified as undefined *Dothideomycetes* (Figure 2, in orange). *Capnodiales* (Figure 2, in green) represented 9 % (79 OTUs; 16,671 reads) of the reads assigned along the all sample: 0 to 35 % of the assigned reads according to each sourdough. Sourdough reads were mainly identified as belonging to the *Saccharomycetales* order (67 % of the natural sourdoughs reads, 320 OTUs; 128,433 reads, Figure 2 in grey): 26 to 99 % of the reads of each sourdough, except in sourdough 14 where less than 0.5 percent of the reads belong to this order. *Hypocreales* represent 1 % of the total natural sourdoughs assigned reads (25 OTUs; 1,786 reads, Figure 2, sky blue), and were represented by 0 to 3 % of the reads depending on the sourdough. Two percent of the total assigned reads belong to the *Xylariales* (18 OTUs; 3,472 reads, Figure 2, in ivory), ranging from 0 to 10 % depending on the sourdough. Finally, 1 % of the reads corresponded to the *Tilletiales* (12 OTUs; 184 reads, Figure 2, in brown) , only found in sourdough 3.



**Figure 2:** UNITE completed assignment to Order. In red = undefined *Fungi*; in blue: undefined *Ascomycota*; in orange = undefined *Dothideomycetes*; in green = *Capnodiales*; in yellow = *Pleosporales*; in grey: *Saccharomycetales*; in blue sky = *Hypocreales*; in ivory = *Xylariales*; in brown = *Tilletiales*. Number 1 to 15 = sourdough identified; 15= synthetic sourdough

## Synthetic sourdough

The synthetic sourdough (sourdough 15), made of flour and *Saccharomycetales* species, presented 31 % of undefined *Dothideomycetes* (Figure 2, in orange), 17 % of *Capnodiales* (Figure 2, in green), 10 % of *Saccharomycetales* (Figure 2, in grey), 3 % of *Hypocreales* (Figure 2, in sky blue), 7 % of *Xylariales* (Figure 2, in ivory) and 1 % of *Tilletiales* (Figure 2, in brown).

### 3.4.2. Assignment to the species level

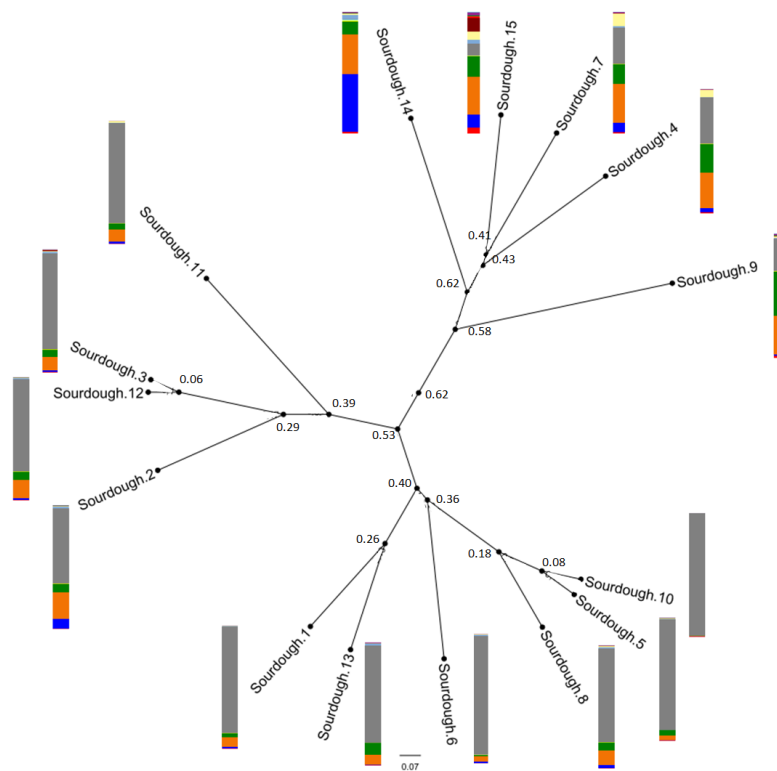
A total of 402 OTUs representing 120,388 reads (59 % of the total number of assigned reads) were assigned to 43 species (Table 12). Most of the reads (92 %) assigned to the species level were identified as 12 *Saccharomycetales* species: *Candida humilis* (43 % of the reads assigned to species level), *K. bulderi* (21 %), *K. barnettii* (11 %), *K. exigua* (11 %), *Kazachstania unispora* (5 %), *Saccharomyces cerevisiae* (1 %) and *Hyphopichia pseudoburtonii*, *Debaryomyces prosopidis*, *Pichia burtonii*, *Torulaspora delbrueckii*, *K. aerobia*, *C. carpophila* (representing less than 1 % of the reads assigned at the species level (Table 12).

**Table 12:** Read number assigned to the species level in each sourdough. SD = sourdough; SD\_15= synthetic sourdough

Phylum name	class name	order name	family name	genus name	species name	SD 14	SD 1	SD 12	SD 3	SD 4	SD 15	SD 11	SD 13	SD 7	SD 6	SD 9	SD 5	SD 10	SD 8	SD 2	total	proportion
Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Davidiellaceae	Cladosporium	Cladosporium sp 4 MU_2012		1	2	3	1	4	2	7	5	1	2					30	0,00
				Davidiella	Davidiella tassiana	28	5	4	10	32	12	13	44	36	2	16	13	1	16	14	246	0,00
			Incertae sedis	Capnobotryella	Capnobotryella sp MA 4775	19	5	3	2	15	22	8	4	30	1	11	4		13	10	147	0,00
		Pleosporales	Pleosporaceae	Drechslera	Drechslera triseptata					1		1		4					1	4	11	0,00
				Pyrenophora	Pyrenophora chaetomioides	7	3	4	4	8	6		3		2	5			1	4	47	0,00
				Aspergillus	Aspergillus conicus	9			1		2										12	0,00
	Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae	Aspergillus	Aspergillus flavus						9								1		10	0,00
				Aspergillus	Aspergillus penicillioides										5						5	0,00
				Penicillium	Penicillium polonicum	3		4		1	1	2		6	1					1	19	0,00
				Candida	Candida carpophila						6	1		1	1				13		22	0,00
				Debaryomyces	Debaryomyces prosopidis		25	52	11	24	290	10496		5431	17	3	9762	13512	12043	61	51727	0,43
				Metschnikowiaceae	Hyphopichia	Hyphopichia pseudoburtonii	2		3		280	2	7	1		5			9		309	0,00
	Saccharomycetes	Saccharomycetales	Pichiaceae	Pichia	Pichia burtonii	35							1	1					1		38	0,00
				Kazachstania	Kazachstania aerobia													23		1	24	0,00
					Kazachstania barnettii		2	13	1				12447			35	119	1	165		12783	0,11
					Kazachstania bulderi			9740	9515	4993	221	4		1		1			294	1	24770	0,21
					Kazachstania exigua		11734	19			52	1		1					121	1348	13276	0,11
					Kazachstania unispora		1	6			18			2					59	5690	5776	0,05
				Saccharomyces	Saccharomyces cerevisiae		20	6			49	5	1			1715	40	23	42		1901	0,02
				Torulaspora	Torulaspora delbrueckii		1				16		16	1					1		35	0,00
	Sordariomycetes	Hypocreales	Clavicipitaceae	Claviceps	Claviceps purpurea	60	2	3	72	15	189	8	231	167	152	20	15	3	31	22	990	0,01
			Nectriaceae	Fusarium	Fusarium poae	353	30	97	68	11	107	17	10	48	13	22	8	2	123	114	1023	0,01
		Xylariales	Incertae sedis	Monographella	Monographella nivalis	139	21	21	59	773	689	178	8	1859	97	79	51	2	148	37	4161	0,03
Basidiomycota	Exobasidiomycetes	Incertae sedis	Incertae sedis	Tilletiopsis	Tilletiopsis minor	8			5					5							18	0,00
				Tilletiopsis	Tilletiopsis sp OVB10_013					2				3						1	6	0,00
		Tilletiales	Tilletiaceae	Tilletia	Tilletia bromi	9		5	85		1112	10	9	22	7				29	8	1296	0,01
	Microbotryomycetes	Sporidiobolales	Incertae sedis	Rhodotorula	Rhodotorula mucilaginosa						20	2		1							23	0,00
				Rhodotorula	Rhodotorula phylloplana	2										3					5	0,00
				Sporobolomyces	Sporobolomyces roseus	5	3	9	12	6	97	1	9	39	3	8	3		11	8	214	0,00
				Sporobolomyces	Sporobolomyces ruberrimus	1		1	3		3				2		1			1	12	0,00
	Tremellomycetes	Cystofilobasidiales	Cystofilobasidiaceae	Itersonilia	Itersonilia perplexans		4				2			1					1		8	0,00
				Udeniomyces	Udeniomyces pannonicus	5		3	14	7	10		8	2		14			3	4	70	0,00
				Udeniomyces	Udeniomyces pyricola	1			1				1			1	1				5	0,00
		Filobasidiales	Filobasidiaceae	Cryptococcus	Cryptococcus oereisensis	8	2	1			2		1	3	1	3			1	1	23	0,00
					Cryptococcus wieringae	38	15	24	16		63		14	9	6	39	19		7	29	279	0,00
					Cryptococcus sp VP_2009b	8	2	1	3	3	25	1	1	18		8	1		3		74	0,00
					Cryptococcus victoriae	80	12	19	34	61	183	7	67	121	18	65	27	3	42	17	756	0,01
					Dioszegia fristingensis						7				1		1	2			11	0,00
					Dioszegia hungarica	8		1	5	6	18		7	11	1	5	4		1	5	72	0,00
		Trichosporonales	Trichosporonaceae	Trichosporon	Trichosporon moniliforme					3									2		5	0,00
	Ustilaginomycetes	Ustilaginales	Ustilaginaceae	Pseudozyma	Pseudozyma flocculosa	4		2			1			2	1	1			2	5	18	0,00
				Sporisorium	Sporisorium sp UL143	2	1	1	5	8	44	1	2	24		20	2		5	11	126	0,00

### 3.4 Species diversity analyses

Alpha and beta diversities were calculated. Alpha diversity varied from one sourdough to another (Supplementary material 4). There was a lower diversity into sourdough 9 comparing to the other sourdoughs, and a higher diversity into the sourdoughs 4, 7 and 9, depending on the indexes analyzed. Synthetic sourdough harbored the higher diversity. Beta diversity between-sample community dissimilarity was estimated thanks to weighted UniFrac distance (Figure 3). Two distinct groups were observed with a 0.62 bootstrap value: groups were separated 62 times on 100 simulations). In group 1 (sourdoughs 4, 7, 9, 14 and 15), sourdoughs were more different than in the group 2 (sourdoughs 1, 2, 3, 5, 6, 8, 10, 11, 12 and 13) with bootstrap values of 0.58, 0.62, 0.43 and 0.41). The majority of reads in group 1 sourdoughs belonged to the *Dothideomycetes* order (in orange, Figure 3) except sourdough 14 where the majority of OTUs were undefined after the phylum Ascomycota (in blue, Figure 3). Group 2 was mainly represented by *Saccharomycetales* sequences (in grey, Figure 8). According to Kurtzman & Robnett (2003) classification, the group 2 reads were mainly represented by species belonging to *Kazachstania* genus (*C. humilis* in sourdoughs 5, 6, 8, 10 and 11; *Kazachstania unispora* in sourdough 2; *K. bulderi* in sourdoughs 3 and 12; *K. barnettii* in sourdough 13; *K. exigua* in sourdough 1, table 11, in sourdough 6 assignment of the most represented OTU corresponded to *C. humilis* with the not completed databases). Group 2 could be divided in 2 sub-groups: group 2a (sourdoughs 3, 12, 2 and 11) and group 2b (sourdoughs 6, 8, 5, 10, 1 and 13), separated by a 0.53 bootstrap node value. Into each sub-group, two sourdoughs fungi communities appeared to be very close: sourdoughs 3 and 12 in one sub-group, and sourdoughs 5 and 10 in the other.



**Figure 3:** Weighted UniFrac distances and bootstrap values associated to the fungi communities of the samples. Bar charts of the order identified by pyrosequencing (to refer to Figure 2 for legend).

#### 4. Discussion

In this work, we analyze fungal communities in a particular matrix containing a large amount of plant DNA by culture and non-culture based approaches. We developed a culture independent method for analyzing fungal community in cereal-based matrix. We tested our method on a synthetic sourdough composed of flour and *Saccharomycetales* species in equal proportion. The *Saccharomycetales* species were identified in synthetic sourdough (sourdough 15) in low proportions (9.4 % of the total sourdough's reads). By contrast, plant pathogen were represented in large proportion in sourdough 15: for example *Tilletia* genus, represented by *Tilletia bromi* species (= *T. fusca*; Boyd & Carris 1997) corresponding to 11 % of this sourdough reads. The low representation of *Saccharomycetales* may be related to PCR or amplicon pyrosequencing problem, or may reflect that we have not added enough yeast cells in our synthetic sourdough before freezing it. The high proportion of non *Saccharomycetales* reads could reflect the natural flour composition. We know that microbial pathogens density can be reduced by the production of metabolic inhibitor such as alcohol, acids and carbon dioxide along the fermentation process (Caplice & Fitzgerald 1999). Pathogens density can also be reduced by the low pH of sourdough, rising the bacteriocins activity (Garcerá *et al.*, 1993; Mortvedt-Abildgaard *et al.*, 1995). When sourdough is maintained, microorganisms responsible for



fermentation are naturally selected and pH decreased, reducing plant pathogens. This could be a reason for the small proportion of plant pathogen reads in natural sourdoughs. Flour without yeast addition should be analyzed to confirm this purpose and compare the fungi composition of flour and sourdough.

In this work, we compared assignment results of four different reference databases. By adding sourdough strain sequences to the public databases, we improved the rate of OTUs assignment at the species' level (data not shown). Indeed, the "UNITE completed" database was not sufficient to assign all OTU reads despite the addition of sourdough strain ITS1 sequences (59 % of the assigned reads were assigned to the species level). Different databases exist to assign rDNA regions: INSD (international nucleotide sequence database), GenBank (Benson *et al.*, 2005), ENA, DDBJ (Nakamura *et al.*, 2013), SILVA (Pruesse *et al.*, 2007), Ribosomal database Project II (Cole *et al.*, 2005), FUSARIUM-ID (Geiser *et al.*, 2004) and UNITE databases. We choose the last one because of its specificity to fungi and its composition with the non translate part of rDNA region (ITS1 -5.8S- ITS2, Kõljalg *et al.*, 2013). We also choose the UCHIME database, supposed to contain exclusively ITS1 regions thanks to ITSx software. Both databases were completed with sourdough/CIRM strain sequences when the sequences were not already present in the database. We observed that the presence of SSU part in the reference database may alter assignment in favor of the sequence containing SSU part (data not shown) justifying the use of database containing ITS region exclusively. Specificity and sensitivity results were quite satisfying for both completed databases with a higher specificity for "UNITE completed". Redundancy of the ITS1 database sequences was unpredictably took into account (when two or more reference sequences were identical in the database, corresponded OTUs were randomly assigned to one of the reference sequences). Therefore, we choose to analyze the data assigned with UNITE completed database. To be used, ITS1 database have to be cleaned to delete the redundancy and trim to contain exclusively ITS1 region, starting and finishing at the same nucleotide. However, both databases present errors and lack of precision for certain taxa: taxonomical definitions have to be modified for "*Candida*" or "*Incertae sedis*" for example. UNITE completed database contains 17,275 sequences, representing about 1 % of the 1.5 million of fungi species (Hawksworth 2001). UNITE should be completed to contain sequences corresponding to all the 100,000 fungi described species (Ainsworth 2008), especially to include the 1,100 known species of *Saccharomycetales*. Finally, reassignment tests were performed on previously non assigned OTUs to the species level (3.5 % of the non assigned with "UNITE completed" database to the level species OTUS were reassigned with "UNITE completed"; 4.7 % of the non assigned with "ITS1 completed" database to the level species OTUS were reassigned with "ITS1 completed". We suggest analyzing pyrosequencing data with the last available version (2.10) of RDP classifier when it will be implemented in QIIM by the developers and with BLAST method.

Similar results were obtained by cultural and non-cultural approaches for the dominant species. However, the pyrosequencing approach allowed describing more deeply the fungi community: one to two species were identified per sourdough by the culture based method whereas from 10 to 32 species were identified per sourdough by non-culture based method. Thus, pyrosequencing approach gave semi-quantitative results on a large number of reads and was used to quantify species diversity with more resolution than with cultural method.

As expected in fermented product (Illegghems *et al.*, 2012; Jung *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2011), *Saccharomycetales* species dominate in all the natural sourdoughs but the sourdoughs 14. *Kazachstania* species were the most represented species: *C. humilis* (45.9 % of the isolates, 26 % of the reads assigned), *K. bulderi*, *K. barnettii*, *K. exigua* and *K. unispora*. Sourdough 6 reads were identified as *Saccharomycetales* but could not be assigned to the species level with the "UNITE completed" database. However, they were assigned to the *C. humilis* with the not completed databases. After manual verification (blast of the OTU represented sequence on the NCBI nt/nr database), we confirmed the *C. humilis* assignment.

Alpha diversity varied from one sourdough to another. Beta diversity analysis highlighted two major diversity patterns: communities with or without dominant *Saccharomycetales*. The non *Saccharomycetales* species were mostly represented by plant pathogen including five species identified in all the sourdoughs: *Davidiella tassiana* (*Capnoidiales* order), *Claviceps purpurea* (*Hypocreales*), *Fusarium poae* (*Hypocreales*), *Monographella nivalis* (*Xylariales*) and *Cryptococcus victoria* (*Filobasidiales*) but were identified at low proportion in natural sourdoughs (less than 1 % of each sample in sourdough 1 to 13). Interestingly, no *Saccharomycetales* species were shared by all the sourdoughs.

In addition to highlight the importance of completing reference databases used for pyrosequencing amplicon assignments, this study described the fungal composition of natural organic French sourdoughs. Each natural sourdough presented a particular fungal diversity, mainly represented by *Kazachstania* species.

## REFERENCES

- Ainsworth, Geoffrey Clough. 2008. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*. CABI.
- Alegria, Ángel, Pawel Szczesny, Baltasar Mayo, Jacek Bardowski, et Magdalena Kowalczyk. 2012. « Biodiversity in Oscypek, a Traditional Polish Cheese, Determined by Culture-Dependent and -Independent Approaches ». *Applied and Environmental Microbiology* 78 (6): 1890-98. doi:10.1128/AEM.06081-11.
- Bai, Mei, Manjun Qing, Zhuang Guo, Yong Zhang, Xia Chen, Qiuhua Bao, Heping Zhang, et Tian-song Sun. 2010. « Occurrence and dominance of yeast species in naturally fermented milk from the Tibetan Plateau of China ». *Canadian Journal of Microbiology* 56 (9): 707-14. doi:10.1139/W10-056.
- Baldrian, Petr, Miroslav Kolařík, Martina Štursová, Jan Kopecký, Vendula Valášková, Tomáš Větrovský, Lucia Žifčáková, et al. 2012. « Active and Total Microbial Communities in Forest Soil Are Largely Different and Highly Stratified during Decomposition ». *The ISME Journal* 6 (2): 248-58. doi:10.1038/ismej.2011.95.
- Bazzicalupo, Anna L., Miklós Bálint, et Imke Schmitt. 2013. « Comparison of ITS1 and ITS2 rDNA in 454 sequencing of hyperdiverse fungal communities ». *Fungal Ecology* 6 (1): 102-9. doi:10.1016/j.funeco.2012.09.003.
- Bellemain, Eva, Tor Carlsen, Christian Brochmann, Eric Coissac, Pierre Taberlet, et Håvard Kauserud. 2010. « ITS as an Environmental DNA Barcode for Fungi: An in Silico Approach Reveals Potential PCR Biases ». *BMC Microbiology* 10 (1): 189. doi:10.1186/1471-2180-10-189.
- Bengtsson-Palme, Johan, Martin Ryberg, Martin Hartmann, Sara Branco, Zheng Wang, Anna Godhe, Pierre De Wit, et al. 2013. « Improved Software Detection and Extraction of ITS1 and ITS2 from Ribosomal ITS Sequences of Fungi and Other Eukaryotes for Analysis of Environmental Sequencing Data ». *Methods in Ecology and Evolution* 4 (10): 914-19. doi:10.1111/2041-210X.12073.
- Benson, Dennis A., Ilene Karsch-Mizrachi, David J. Lipman, James Ostell, et David L. Wheeler. 2005. « GenBank ». *Nucleic Acids Research* 33 (suppl 1): D34-38. doi:10.1093/nar/gki063.
- Birch, Anja N., Mikael A. Petersen, Nils Arneborg, et Åse S. Hansen. 2013. « Influence of commercial baker's yeasts on bread aroma profiles ». *Food Research International* 52 (1): 160-66. doi:10.1016/j.foodres.2013.03.011.
- Boulton, Christopher, et David Quain. 2008. *Brewing Yeast and Fermentation*. John Wiley & Sons.
- Bourdichon, François, Serge Casaregola, Choreh Farrokh, Jens C. Frisvad, Monica L. Gerds, Walter P. Hammes, James Harnett, et al. 2012. « Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use ». *International Journal of Food Microbiology* 154 (3): 87-97. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.030.
- Boyanton, Bobby L., Ruth Ann Luna, Lea R. Fasciano, Kyle G. Menne, et James Versalovic. 2008. « DNA pyrosequencing-based identification of pathogenic *Candida* species by using the internal transcribed spacer 2 region ». *Archives of pathology & laboratory medicine* 132 (4): 667-74.

- Boyd, MaríA L., et Lori M. Carris. 1997. « Molecular relationships among varieties of the *Tilletia fusca* (T. bromi) complex and related species ». *Mycological Research* 101 (3): 269-77. doi:10.1017/S0953756296002523.
- Bridge, P. D., B. M. Spooner, et P. J. Roberts. 2005. « The Impact of Molecular Data in Fungal Systematics ». In *Advances in Botanical Research*, édité par J.A. Callow, Volume 42:33-67. Advances in Botanical Research Incorporating Advances in Plant Pathology. Academic Press. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065229605420029>.
- Brock, Thomas D., et Michael T. Madigan. 1991. *Biology of Microorganisms*. 6th Edition. Upper Saddle River, NJ Hardcover: Prentice Hall. <http://www.abebooks.com/Biology-Microorganisms-6th-Edition-Brock-Thomas/780911915/bd>.
- Caplice, Elizabeth, et Gerald F. Fitzgerald. 1999. « Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation ». *International journal of food microbiology* 50 (1): 131-49.
- Caporaso, J. Gregory, Justin Kuczynski, Jesse Stombaugh, Kyle Bittinger, Frederic D. Bushman, Elizabeth K. Costello, Noah Fierer, et al. 2010. « QIIME Allows Analysis of High-Throughput Community Sequencing Data ». *Nature Methods* 7 (5): 335-36. doi:10.1038/nmeth.f.303.
- Cole, J. R., B. Chai, R. J. Farris, Q. Wang, S. A. Kulam, D. M. McGarrell, G. M. Garrity, et J. M. Tiedje. 2005. « The Ribosomal Database Project (RDP-II): Sequences and Tools for High-Throughput rRNA Analysis ». *Nucleic Acids Research* 33 (suppl 1): D294-96. doi:10.1093/nar/gki038.
- Csoma, H., N. Zakany, A. Capece, P. Romano, et M. Sipiczki. 2010. « Biological Diversity of *Saccharomyces* Yeasts of Spontaneously Fermenting Wines in Four Wine Regions: Comparative Genotypic and Phenotypic Analysis ». *International Journal of Food Microbiology* 140 (2-3): 239-48. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.024.
- Damiani, P., M. Gobbetti, L. Cossignani, A. Corsetti, M. S. Simonetti, et J. Rossi. 1996. « The Sourdough Microflora. Characterization of Hetero- and Homofermentative Lactic Acid Bacteria, Yeasts and Their Interactions on the Basis of the Volatile Compounds Produced ». *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* 29 (1-2): 63-70.
- Daniel, H. M., et W. Meyer. 2003. « Evaluation of Ribosomal RNA and Actin Gene Sequences for the Identification of Ascomycetous Yeasts ». *International Journal of Food Microbiology* 86 (1-2): 61-78. doi:10.1016/S0168-1605(03)00248-4.
- Degroeve, S., Y. Saeys, B. De Baets, P. Rouze, et Y. Van de Peer. 2005. « SpliceMachine: Predicting Splice Sites from High-Dimensional Local Context Representations ». *Bioinformatics* 21 (8): 1332-38. doi:10.1093/bioinformatics/bti166.
- Edgar, Robert C. 2010. « Search and Clustering Orders of Magnitude Faster than BLAST ». *Bioinformatics* 26 (19): 2460-61. doi:10.1093/bioinformatics/btq461.
- Egger, Keith N. 1995. « Molecular analysis of ectomycorrhizal fungal communities ». *Canadian Journal of Botany* 73 (S1): 1415-22. doi:10.1139/b95-405.
- Eisenhauer, Nico, Wiebke Schulz, Stefan Scheu, et Alexandre Jousset. 2013. « Niche Dimensionality Links Biodiversity and Invasibility of Microbial Communities ». *Functional Ecology* 27 (1): 282-88. doi:10.1111/j.1365-2435.2012.02060.x.

- Encinas, Juan-Pablo, Teresa-María López-Díaz, María-Luisa García-López, Andrés Otero, et Benito Moreno. 2000. « Yeast populations on Spanish fermented sausages ». *Meat Science* 54 (3): 203-8.
- Ercolini, Danilo, Francesca De Filippis, Antonietta La Stora, et Michele Iacono. 2012. « “Remake” by High-Throughput Sequencing of the Microbiota Involved in the Production of Water Buffalo Mozzarella Cheese ». *Applied and Environmental Microbiology* 78 (22): 8142-45. doi:10.1128/AEM.02218-12.
- Ganter, Philip F. 2006. « Yeast and Invertebrate Associations ». In *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*, édité par Dr Gábor Péter et Professor Carlos Rosa, 303-70. The Yeast Handbook. Springer Berlin Heidelberg. [http://link.springer.com/chapter/10.1007/3-540-30985-3\\_14](http://link.springer.com/chapter/10.1007/3-540-30985-3_14).
- Garcerá, Maria J. García, Marieke G. L. Elferink, Arnold J. M. Driessen, et Wil N. Konings. 1993. « In Vitro Pore-Forming Activity of the Lantibiotic Nisin ». *European Journal of Biochemistry* 212 (2): 417-22. doi:10.1111/j.1432-1033.1993.tb17677.x.
- Gardes, M., et T. D. Bruns. 1993. « ITS Primers with Enhanced Specificity for Basidiomycetes - Application to the Identification of Mycorrhizae and Rusts ». *Molecular Ecology* 2 (2): 113-18. doi:10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x.
- Gargas, Andrea, et Paula T. DePriest. 1996. « A Nomenclature for Fungal PCR Primers with Examples from Intron-Containing SSU rDNA ». *Mycologia* 88 (5): 745. doi:10.2307/3760969.
- Gazis, Romina, Stephen Rehner, et Priscila Chaverri. 2011. « Species Delimitation in Fungal Endophyte Diversity Studies and Its Implications in Ecological and Biogeographic Inferences ». *Molecular Ecology* 20 (14): 3001-13. doi:10.1111/j.1365-294X.2011.05110.x.
- Geiser, David M., María del Mar Jiménez-Gasco, Seogchan Kang, Izabela Makalowska, Narayanan Veeraraghavan, Todd J. Ward, Ning Zhang, Gretchen A. Kuldau, et Kerry O'Donnell. 2004. « FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying Fusarium ». In *Molecular Diversity and PCR-detection of Toxigenic Fusarium Species and Ochratoxigenic Fungi*, 473-79. Springer. [http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4020-2285-2\\_2](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4020-2285-2_2).
- Hansen, A., et P. Schieberle. 2005. « Generation of aroma compounds during sourdough fermentation: applied and fundamental aspects ». *Trends in Food Science & Technology*, Second International Symposium on Sourdough - From Fundamentals to Applications Second International Symposium on Sourdough - From Fundamentals to Applications, 16 (1-3): 85-94. doi:10.1016/j.tifs.2004.03.007.
- Hawksworth, D. L. 2001. « The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited ». *Mycological Research* 105 (12): 1422-32. doi:10.1017/S0953756201004725.
- Head, I. M., J. R. Saunders, et R. W. Pickup. 1998. « Microbial Evolution, Diversity, and Ecology: A Decade of Ribosomal RNA Analysis of Uncultivated Microorganisms ». *Microbial Ecology* 35 (1): 1-21. doi:10.1007/s002489900056.
- Horton, Thomas R., et Thomas D. Bruns. 2001. « The Molecular Revolution in Ectomycorrhizal Ecology: Peeking into the Black-Box ». *Molecular Ecology* 10 (8): 1855-71. doi:10.1046/j.0962-1083.2001.01333.x.

- Humblot, Christèle, et Jean-Pierre Guyot. 2009. « Pyrosequencing of Tagged 16S rRNA Gene Amplicons for Rapid Deciphering of the Microbiomes of Fermented Foods Such as Pearl Millet Slurries ». *Applied and Environmental Microbiology* 75 (13): 4354-61. doi:10.1128/AEM.00451-09.
- Ihrmark, Katarina, Inga T.M. Bödeker, Karelyn Cruz-Martinez, Hanna Friberg, Ariana Kubartova, Jessica Schenck, Ylva Strid, *et al.* 2012. « New Primers to Amplify the Fungal ITS2 Region – Evaluation by 454-Sequencing of Artificial and Natural Communities ». *FEMS Microbiology Ecology* 82 (3): 666-77. doi:10.1111/j.1574-6941.2012.01437.x.
- Illegheems, Koen, Luc De Vuyst, Zoi Papalexandratou, et Stefan Weckx. 2012. « Phylogenetic Analysis of a Spontaneous Cocoa Bean Fermentation Metagenome Reveals New Insights into Its Bacterial and Fungal Community Diversity ». *PLoS ONE* 7 (5): e38040. doi:10.1371/journal.pone.0038040.
- Jeong, Sang Hyeon, Ji Young Jung, Se Hee Lee, Hyun Mi Jin, et Che Ok Jeon. 2013. « Microbial succession and metabolite changes during fermentation of dongchimi, traditional Korean watery kimchi ». *International Journal of Food Microbiology* 164 (1): 46-53. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.03.016.
- Jeong, Sang Hyeon, Hyo Jung Lee, Ji Young Jung, Se Hee Lee, Hye-Young Seo, Wan-Soo Park, et Che Ok Jeon. 2013. « Effects of red pepper powder on microbial communities and metabolites during kimchi fermentation ». *International Journal of Food Microbiology* 160 (3): 252-59. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.10.015.
- Jung, Ji Young, Se Hee Lee, Jeong Myeong Kim, Moon Su Park, Jin-Woo Bae, Yoonsoo Hahn, Eugene L. Madsen, et Che Ok Jeon. 2011. « Metagenomic Analysis of Kimchi, a Traditional Korean Fermented Food ». *Applied and Environmental Microbiology* 77 (7): 2264-74. doi:10.1128/AEM.02157-10.
- Jung, Ji Young, Se Hee Lee, Hyo Jung Lee, et Che Ok Jeon. 2013. « Microbial succession and metabolite changes during fermentation of saeu-jeot: Traditional Korean salted seafood ». *Food Microbiology* 34 (2): 360-68. doi:10.1016/j.fm.2013.01.009.
- Jung, Mi-Ja, Young-Do Nam, Seong Woon Roh, et Jin-Woo Bae. 2012. « Unexpected Convergence of Fungal and Bacterial Communities during Fermentation of Traditional Korean Alcoholic Beverages Inoculated with Various Natural Starters ». *Food Microbiology* 30 (1): 112-23. doi:10.1016/j.fm.2011.09.008.
- Kachalkin, Aleksey V., et Andrey M. Yurkov. 2012. « Yeast Communities in Sphagnum Phyllosphere along the Temperature-Moisture Ecocline in the Boreal Forest-Swamp Ecosystem and Description of *Candida Sphagnicola* Sp. Nov. ». *Antonie van Leeuwenhoek* 102 (1): 29-43. doi:10.1007/s10482-012-9710-6.
- Kan, Virginia L. 1993. « Polymerase Chain Reaction for the Diagnosis of Candidemia ». *Journal of Infectious Diseases* 168 (3): 779-83. doi:10.1093/infdis/168.3.779.
- Kim, Yi-Seul, Min-Cheol Kim, Soon-Wo Kwon, Soo-Jin Kim, In-Cheol Park, Jong-Ok Ka, et Hang-Yeon Weon. 2011. « Analyses of Bacterial Communities in Meju, a Korean Traditional Fermented Soybean Bricks, by Cultivation-Based and Pyrosequencing Methods ». *The Journal of Microbiology* 49 (3): 340-48. doi:10.1007/s12275-011-0302-3.

- Kiyohara, Masashi, Takashi Koyanagi, Hiroshi Matsui, Keiko Yamamoto, Harumi Take, Yoko Katsuyama, Atsushi Tsuji, *et al.* 2012. « Changes in Microbiota Population during Fermentation of Narezushi as Revealed by Pyrosequencing Analysis ». *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 76 (1): 48-52. doi:10.1271/bbb.110424.
- Kõljalg, Urmas, R. Henrik Nilsson, Kessy Abarenkov, Leho Tedersoo, Andy F. S. Taylor, Mohammad Bahram, Scott T. Bates, *et al.* 2013. « Towards a Unified Paradigm for Sequence-Based Identification of Fungi ». *Molecular Ecology* 22 (21): 5271-77. doi:10.1111/mec.12481.
- Koyanagi, T., M. Kiyohara, H. Matsui, K. Yamamoto, T. Kondo, T. Katayama, *et al.* 2011. « Pyrosequencing Survey of the Microbial Diversity of Narezushi', an Archetype of Modern Japanese Sushi ». *Letters in Applied Microbiology* 53 (6): 635-40. doi:10.1111/j.1472-765X.2011.03155.x.
- Kurtzman, C. P., *et al.* C. J. Robnett. 2003. « Phylogenetic Relationships among Yeasts of the "Saccharomyces Complex" Determined from Multigene Sequence Analyses ». *Fems Yeast Research* 3 (4): 417-32. doi:10.1016/S1567-1356(03)00012-6.
- Leite, A.M.O., B. Mayo, C.T.C.C. Rachid, R.S. Peixoto, J.T. Silva, V.M.F. Paschoalin, *et al.* S. Delgado. 2012. « Assessment of the Microbial Diversity of Brazilian Kefir Grains by PCR-DGGE and Pyrosequencing Analysis ». *Food Microbiology* 31 (2): 215-21. doi:10.1016/j.fm.2012.03.011.
- Lhomme, E., C. Urien, J. Legrand, X. Dousset, B. Onnot & D. Sicard. Accepted. Sourdough microbial community dynamics: an analysis during French organic bread-making processes. *Food Microbiology*.
- Lindahl, Bjorn D, R Henrik Nilsson, Leho Tedersoo, Kessy Abarenkov, Tor Carlsen, Rasmus Kjeller, Urmas Koljalg, *et al.* 2013. « Fungal community analysis by high-throughput sequencing of amplified markers - a user's guide ». *The New Phytologist* 199 (1): 288-99. doi:10.1111/nph.12243.
- Liu, Lin, Yinhu Li, Siliang Li, Ni Hu, Yimin He, Ray Pong, Danni Lin, Lihua Lu, *et al.* Maggie Law. 2012. « Comparison of Next-Generation Sequencing Systems ». *BioMed Research International* 2012 (juillet): e251364. doi:10.1155/2012/251364.
- Li, Xiao-Ran, En-Bo Ma, Liang-Zhen Yan, Han Meng, Xiao-Wei Du, Sheng-Wan Zhang, *et al.* Zhe-Xue Quan. 2011. « Bacterial and Fungal Diversity in the Traditional Chinese Liquor Fermentation Process ». *International Journal of Food Microbiology* 146 (1): 31-37. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.030.
- Lozupone, C., *et al.* R. Knight. 2005. « UniFrac: A New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities ». *Applied and Environmental Microbiology* 71 (12): 8228-35. doi:10.1128/AEM.71.12.8228-8235.2005.
- Mariotte, Pierre, Charlotte Vandenberghe, Claire Meugnier, Pierre Rossi, Richard D. Bardgett, *et al.* Alexandre Buttler. 2013. « Subordinate plant species impact on soil microbial communities and ecosystem functioning in grasslands: Findings from a removal experiment ». *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 15 (2): 77-85. doi:10.1016/j.ppees.2012.12.003.
- Martinez-Anaya, M. A., B. Pitarch, P. Bayarri, *et al.* C. Benedito De Barber. 1990. « Microflora of the sourdoughs of wheat flour bread. X. Interactions between yeasts and lactic acid bacteria in wheat doughs and their effects on bread quality ». *Cereal chem* 67 (1): 85-91.

- Martin, Kendall J., et Paul T. Rygielwicz. 2005. « Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts ». *BMC microbiology* 5 (1): 28.
- Masoud, Wafa, Monica Takamiya, Finn K. Vogensen, Søren Lillevang, Waleed Abu Al-Soud, Søren J. Sørensen, et Mogens Jakobsen. 2011. « Characterization of bacterial populations in Danish raw milk cheeses made with different starter cultures by denaturing gradient gel electrophoresis and pyrosequencing ». *International Dairy Journal* 21 (3): 142-48. doi:10.1016/j.idairyj.2010.10.007.
- Matsumoto, Makoto, et Takuji Nishimura. 1998. « Mersenne Twister: A 623-dimensionally Equidistributed Uniform Pseudo-random Number Generator ». *ACM Trans. Model. Comput. Simul.* 8 (1): 3-30. doi:10.1145/272991.272995.
- Mello, Antonietta, Chiara Napoli, Claude Murat, Emmanuelle Morin, Giuseppe Marceddu, et Paola Bonfante. 2011. « ITS-1 versus ITS-2 Pyrosequencing: A Comparison of Fungal Populations in Truffle Grounds ». *Mycologia* 103 (6): 1184-93. doi:10.3852/11-027.
- Mendonça, Regina C.S., Delaine M. Gouvêa, Humberto M. Hungaro, Arthur de F. Sodré, et Amparo Querol-Simon. 2013. « Dynamics of the Yeast Flora in Artisanal Country Style and Industrial Dry Cured Sausage (yeast in Fermented Sausage) ». *Food Control* 29 (1): 143-48. doi:10.1016/j.foodcont.2012.05.057.
- Minervini, Fabio, Raffaella Di Cagno, Anna Lattanzi, Maria De Angelis, Livio Antonielli, Gianluigi Cardinali, Stefan Cappelle, et Marco Gobetti. 2012. « Lactic Acid Bacterium and Yeast Microbiotas of 19 Sourdoughs Used for Traditional/Typical Italian Breads: Interactions between Ingredients and Microbial Species Diversity ». *Applied and Environmental Microbiology* 78 (4): 1251-64. doi:10.1128/AEM.07721-11.
- Mortvedt-Abildgaard, C. I., Jon Nissen-Meyer, Birthe Jelle, Benedikte Grenov, Morten Skaugen, et Ingolf F. Nes. 1995. « Production and pH-Dependent Bactericidal Activity of Lactocin S, a Lantibiotic from *Lactobacillus sake* L45. » *Applied and environmental microbiology* 61 (1): 175-79.
- Nakamura, Yasukazu, Guy Cochrane, et Ilene Karsch-Mizrachi. 2013. « The International Nucleotide Sequence Database Collaboration ». *Nucleic Acids Research* 41 (D1): D21-24. doi:10.1093/nar/gks1084.
- Nam, Young-Do, So-Young Lee, et Seong-II Lim. 2012. « Microbial community analysis of Korean soybean pastes by next-generation sequencing ». *International Journal of Food Microbiology* 155 (1-2): 36-42. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.01.013.
- Nam, Young-Do, So-lim Park, et Seong-II Lim. 2012. « Microbial Composition of the Korean Traditional Food "kochujang" Analyzed by a Massive Sequencing Technique ». *Journal of Food Science* 77 (4): M250-56. doi:10.1111/j.1750-3841.2012.02656.x.
- Nam, Young-Do, Sung-Hun Yi, et Seong-II Lim. 2012. « Bacterial diversity of cheonggukjang, a traditional Korean fermented food, analyzed by barcoded pyrosequencing ». *Food Control* 28 (1): 135-42. doi:10.1016/j.foodcont.2012.04.028.



- Nguyen, Huu-Vang, et C. Gaillardin. 1997. « Two Subgroups within the *Saccharomyces bayanus* Species Evidenced by PCR Amplification and Restriction Polymorphism of the Non-Transcribed Spacer 2 in the Ribosomal DNA Unit ». *Systematic and Applied Microbiology* 20 (2): 286-94. doi:10.1016/S0723-2020(97)80075-6.
- Orgiazzi, Alberto, Valeria Bianciotto, Paola Bonfante, Stefania Daghino, Stefano Ghignone, Alexandra Lazzari, Erica Lumini, *et al.* 2013. « 454 Pyrosequencing Analysis of Fungal Assemblages from Geographically Distant, Disparate Soils Reveals Spatial Patterning and a Core Mycobiome ». *Diversity* 5 (1): 73-98. doi:10.3390/d5010073.
- Park, Eun-Jin, Jongsik Chun, Chang-Jun Cha, Wan-Soo Park, Che Ok Jeon, et Jin-Woo Bae. 2012. « Bacterial Community Analysis during Fermentation of Ten Representative Kinds of Kimchi with Barcoded Pyrosequencing ». *Food Microbiology* 30 (1): 197-204. doi:10.1016/j.fm.2011.10.011.
- Pedersen, Line Lindegaard, James Owusu-Kwarteng, Line Thorsen, et Lene Jespersen. 2012. « Biodiversity and Probiotic Potential of Yeasts Isolated from Fura, a West African Spontaneously Fermented Cereal ». *International Journal of Food Microbiology* 159 (2): 144-51. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.016.
- Pruesse, Elmar, Christian Quast, Katrin Knittel, Bernhard M. Fuchs, Wolfgang Ludwig, Jörg Peplies, et Frank Oliver Glöckner. 2007. « SILVA: A Comprehensive Online Resource for Quality Checked and Aligned Ribosomal RNA Sequence Data Compatible with ARB ». *Nucleic Acids Research* 35 (21): 7188-96. doi:10.1093/nar/gkm864.
- Reed, Heather E., et Jennifer B. H. Martiny. 2007. « Testing the Functional Significance of Microbial Composition in Natural Communities ». *FEMS Microbiology Ecology* 62 (2): 161-70. doi:10.1111/j.1574-6941.2007.00386.x.
- Roh, Seong Woon, Kyoung-Ho Kim, Young-Do Nam, Ho-Won Chang, Eun-Jin Park, et Jin-Woo Bae. 2010. « Investigation of Archaeal and Bacterial Diversity in Fermented Seafood Using Barcoded Pyrosequencing ». *The ISME Journal* 4 (1): 1-16. doi:10.1038/ismej.2009.83.
- Sakamoto, Naoshige, Shigemitsu Tanaka, Kenji Sonomoto, et Jiro Nakayama. 2011. « 16S rRNA pyrosequencing-based investigation of the bacterial community in nukadoko, a pickling bed of fermented rice bran ». *International Journal of Food Microbiology* 144 (3): 352-59. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.017.
- Schoch, Conrad L., Keith A. Seifert, Sabine Huhndorf, Vincent Robert, John L. Spouge, C. André Levesque, Wen Chen, *et al.* 2012. « Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (16): 6241-46.
- Seifert, Keith A., Robert A. Samson, Jeremy R. deWaard, Jos Houbraken, C. André Lévesque, Jean-Marc Moncalvo, Gerry Louis-Seize, et Paul D. N. Hebert. 2007. « Prospects for Fungus Identification Using CO1 DNA Barcodes, with *Penicillium* as a Test Case ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (10): 3901-6. doi:10.1073/pnas.0611691104.
- Strickland, Michael S., Christian Lauber, Noah Fierer, et Mark A. Bradford. 2009. « Testing the functional significance of microbial community composition ». *Ecology* 90 (2): 441-51. doi:10.1890/08-0296.1.

- Sul, Woo Jun, Stella Asuming-Brempong, Qiong Wang, Dieter M. Tourlousse, C. Ryan Penton, Ye Deng, Jorge L. M. Rodrigues, *et al.* 2013. « Tropical agricultural land management influences on soil microbial communities through its effect on soil organic carbon ». *Soil Biology and Biochemistry* 65 (octobre): 33-38. doi:10.1016/j.soilbio.2013.05.007.
- Swift, Michael John, O. W. Heal, et J. M. Anderson. 1979. *Decomposition in Terrestrial Ecosystems*. University of California Press.
- Taylor, D. Lee, Michael G. Booth, Jack W. Mcfarland, Ian C. Herriott, Niall J. Lennon, Chad Nusbaum, et Thomas G. Marr. 2008. « Increasing Ecological Inference from High Throughput Sequencing of Fungi in the Environment through a Tagging Approach ». *Molecular Ecology Resources* 8 (4): 742-52. doi:10.1111/j.1755-0998.2008.02094.x.
- Tristezza, Mariana, Lorenagostina Fantastico, Cosimo Vetrano, Gianluca Bleve, Daniela Corallo, Francesco Grieco, Giovanni Mita, et Francesco Grieco. 2014. « Molecular and Technological Characterization of *Saccharomyces Cerevisiae* Strains Isolated from Natural Fermentation of Susumaniello Grape Must in Apulia, Southern Italy ». *International Journal of Microbiology* 2014 (janvier): e897428. doi:10.1155/2014/897428.
- Vialle, Agathe, Nicolas Feau, Mathieu Allaire, Maryna Didukh, Francis Martin, Jean-Marc Moncalvo, et Richard C. Hamelin. 2009. « Evaluation of Mitochondrial Genes as DNA Barcode for Basidiomycota ». *Molecular Ecology Resources* 9 (mai): 99-113. doi:10.1111/j.1755-0998.2009.02637.x.
- Vrancken, Gino, Luc De Vuyst, Roel Van der Meulen, Geert Huys, Peter Vandamme, et Heide-Marie Daniel. 2010. « Yeast Species Composition Differs between Artisan Bakery and Spontaneous Laboratory Sourdoughs: Yeast Species Composition in Sourdough ». *FEMS Yeast Research* 10 (4): 471-81. doi:10.1111/j.1567-1364.2010.00621.x.
- Wang, Qiong, George M. Garrity, James M. Tiedje, et James R. Cole. 2007. « Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy ». *Applied and Environmental Microbiology* 73 (16): 5261-67. doi:10.1128/AEM.00062-07.
- Wardle, David A. 1998. « Controls of temporal variability of the soil microbial biomass: A global-scale synthesis ». *Soil Biology and Biochemistry* 30 (13): 1627-37. doi:10.1016/S0038-0717(97)00201-0.
- White, Thomas J., T. Bruns, SJWT Lee, J. W. Taylor, et others. 1990. « Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics ». *PCR protocols: a guide to methods and applications* 18: 315-22.
- Wooley, John C., Adam Godzik, et Iddo Friedberg. 2010. « A Primer on Metagenomics ». *PLoS Comput Biol* 6 (2): e1000667. doi:10.1371/journal.pcbi.1000667.

**Supplementary material 1:** Sourdoughs and bakeries characteristics. Location: latitude, longitude; Chief sourdough- Conservation: TA = room temperature, cold = conservation in fridge or room with temperature lower than 7°C. Chief sourdough - Origin (chief origin regarding to the last bread making process) : dough = piece of bread dough of the previous bread making process, SD (sourdough) = piece of sourdough of the previous bread making process. % sourdough = sourdough percentage in the bread dough. BMR nb/week = number of bread making run per week. Water origin (water origin for the kneading and the bread making processes): tap = untreated water, filtered = filtered or treated water. Flour (location of the grinding process): bakery = flour milled per the baker, miller = flour milled per a miller. Baker yeast: no = no addition of any commercial yeast in the bakery, yes = addition of commercial yeast in the bakery for one other bakery product.

Baker ID	location	status	conservation	age (years)	origin	% sourdough	kneading	BMR nb/week	water origin	flour	wheat cultivars	mill	Baker yeast
1	SO	farmer_baker	TA	12	dough	43	mechanical	2	tap	bakery	mix	millstone	no
2	SO	farmer_baker	cold	<1	dough	16	mechanical	2	tap	bakery	old	millstone	no
3	SE	farmer_baker	cold	10	SD	15	manual	3	tap	bakery	old	millstone	no
4	NO	baker	cold	20	dough	33	mechanical	4	tap	miller	mix	NA	no
5	NO	baker	cold	20	SD	10	mechanical	6	tap	miller	NA	millstone	yes
6	NE	baker	cold	1	dough + SD	17	mechanical	6	tap	miller	modern	millstone	no
7	NO	baker	cold	29	dough	9	mechanical	4	filtered	miller	NA	NA	no
8	NO	baker	TA	33	SD	24	mechanical	7	filtered	miller	NA	millstone	yes
9	NO	baker	TA	2	dough + SD	18	mechanical	5	tap	bakery	modern	NA	yes
10	SE	baker	cold	13	SD	20	mechanical	6	tap	miller	NA	cylinder	no
11	NE	baker	cold	NA	SD	4	mechanical	7	tap	miller	NA	millstone	yes
12	NO	farmer_baker	TA	NA	dough	14	manual	2	filtered	bakery	old	millstone	no
13	NE	baker	cold	<1	dough	11	manual	1	tap	miller	old	millstone	no
14	NE	baker	TA/cold	>15	dough	2	mechanical	4	filetred	miller	NA	millstone	no

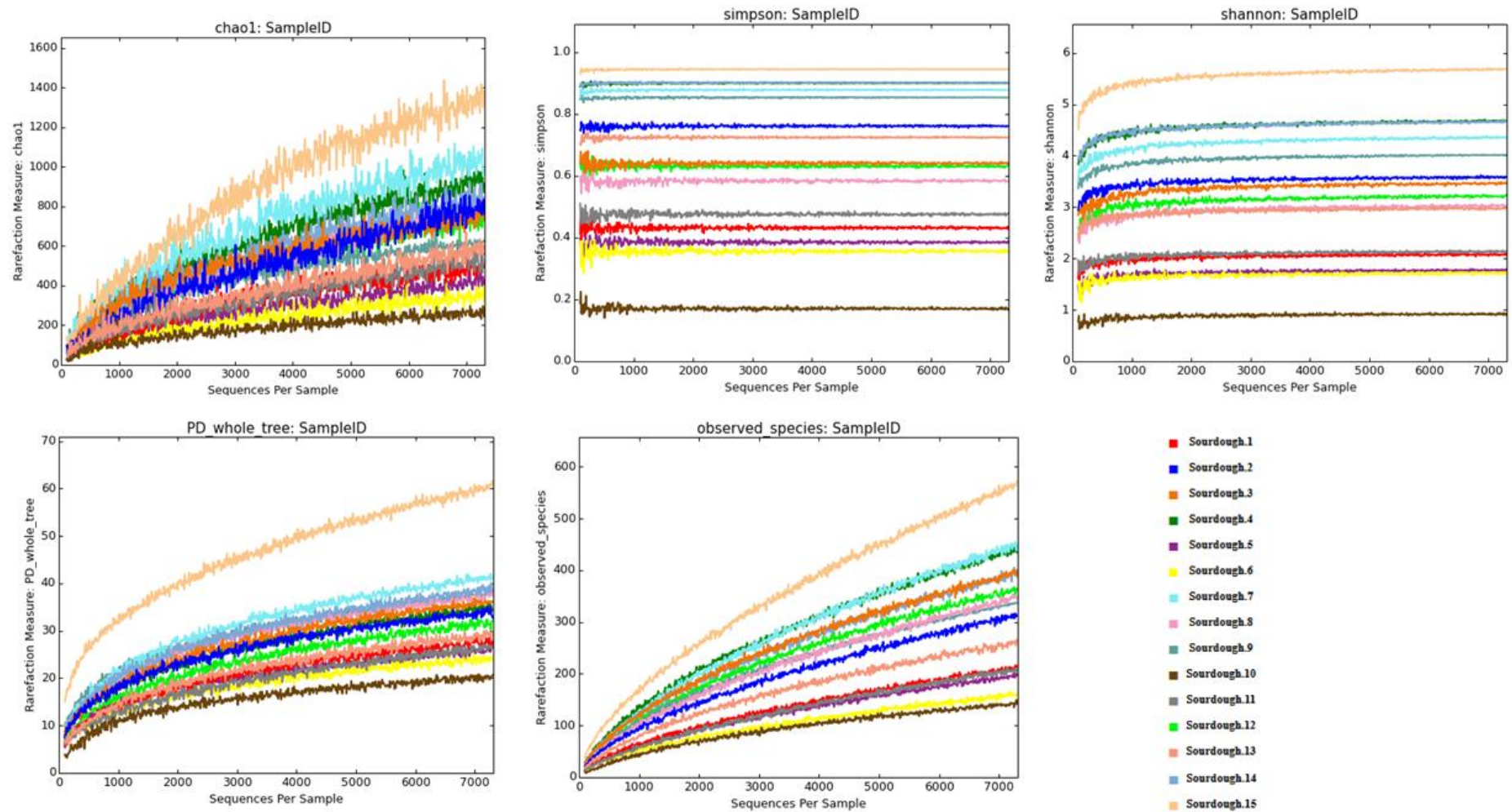
**Supplementary material 2:** Sourdough and CIRM sequences added in “UNITE completed” database. Sequence ID, base pair number and sequence.

SequenceID / bp number	sequence
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 2 218 bp	TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAGTGAATATAGGACGTCCAACCTAACTGGAGTCCGAACCTCTCACTTTCTAACCTGTGCACCTGTTTGGGATAGTAACCTCTCGCAAGAG AGCGAACTCCTATTCACTTATAAACACAAAGTCTAGTAATGTATTAATTTTATAACAAAAATAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATC
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CIRM 75 bp	TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAAATTAATAATTTTGAAAATGGATTTTTTTTTTTTTTTTT
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 1 424 bp	TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAAATTTAATAATTTTGAAAATGGATTTTTTGTGTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAAGCAAGAGATGGAGAGT CCAGCCGGGCTGCGCTTAAGTGCAGGCTTCTGCTAGGCTTGTAAAGTTTCTTTCTGCTATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTAACACCGTTTCAATAC AACACACTGTGGAGTTTTCATATCTTTGCAACTTTTCTTTGGGCATTGAGCAATCGGGGCCAGAGGTAAACAAACACAAACAAATTTTATCTATTCAATAAATTTTGTCAAAAAACAAG AATTTTCGTAACCTGGAAATTTTAAAAATTTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGC
<i>Kazachstania exigua</i> CIRM 292 bp	TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAAATGATGAATAATTTGGTAGAGGAGGATGATCGAGCCTGCGCTTAAGTGCAGCGGCGAGGTTGTTCTTTTCGTTACGCCGATAA TCTTTTACACACTGGAGTTTTATTCTACAGTATCGAGGTAGCAATACGCCAAAAACAAACACAAACAATTTATTTTATTTAAATTTGTCAATTTCAAAATCTGCTTTATTGC AGTAACCAAAATTTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATC
<i>Kazachstania exigua</i> 2 282 bp	TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAAATTAAGATTTCTGGCGGGAGATGTTTGCAGCCTGCGCTTAAGTGCAGCGGCAAGCGGTGTCTCCAATTCACGCTGGTTATTCTT ACACACTGTGGAGTATTTTCTACTTTTATATCGAGGCGCTTGCCTTCAACCAAAAAACAAACAATCTATTTTATTTATACCTAGTCAAAACAAATCTGCTCTGACAGTAACCA AAATATTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCA
<i>Scheffersomyces stipitis</i> CIRM 253 bp	TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACAGTATTTTGTCCAGCGCTTAAGTGCAGCGGCGAAAAACCTTACACACAGTGTTTTCTTTATTAGAAACTATTGCTTTGGTCTGGC TCAGAAATAGTTGGGCCAGAGGTTTACCAAACTCAATTTTATGAATTTGTTATTTTATTAATTTGTCAATTTGTTGATTAAATTCAAAAATCTTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATC
<i>Candida parapsilosis</i> CIRM 213 bp	TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACAGAAATGAAAGTGCCTTAAGTGCATTTTCTTACACATGTGTTTTCTTTTTTGAAAACTTTGCTTTGGTAGGCCTTCTATATGGGG CCTGCCAGAGATTAACCTCAACCAATTTTATTAATGTCAACCGATTATTAATAGTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCA
<i>Torulasporea delbrueckii</i> CIRM 357 bp	TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAGAGAAATCTATAGTAATGAAGTAGAGGACGTCTAAAGATACTGTAAGAGAGGATCAGGTTCAAGACCAGCGCTTAATTCGCGCGGTTGC GGCTTGGTTGCGCTTTTGGCGAACATGCTTTTCTGTTGTTAACTCTACTTCAACTCTACACACTGTGGAGTTTTCTACACAATTTTCTTTTGGGAAGATACGCTTTGTGCGTG CTTCCAGAGGTGACAAACACAAACAACTTTTATTTATTAACCAAGTCAAAACCAATTTTCGTTATGAATTAATAATTTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCA
<i>Kazachstania unispora</i> 2 322 bp	TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATAGAAATATAATTAATTCGTGCTTTGCTTGGAGACACATCTGCCGAACCAAGCGCTTAATTCGCGCGGTTGGTGGGCTCTGTAGCTCA GTAGCACTATTACACACTGTGGAGATTTTATAATCTTTGCTGCTTTTGGGCGAGCTTGGCGAGCCAGAGGTAAACAAACACAAACAACTTTGTAATATTTTAAACCAAGTCAAAACC AGAATTCAGAAAGATTATCTTTTGTAAATATTATAACAAATATTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCAT
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> CIRM 249 bp	TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATAGTATTCTATTGCCAGCGCTTAATTCGCGCGGCGATAAACCTTACACACATTTGTCTAGTTTTTTGAACTTTGCTTTGGTGGTGAGCC TGGCTTACTGCCAAAGGTTAAACACATTTTTTATGTTAAACCTTTAAACCAATAGTCATGAAAAATTTTAAACAAAAATTTAAATCTTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATC
<i>Candida glabrata</i> CIRM 466 bp	TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAAATTTAATTTGTTGCTGAGCTCGGAGAGACATCTCTGGGGAGGACCAAGTGTAGACACTCAGGAGGCTCTTAAAAATATTTTC TCTGCTGTAATGCTATTCTCTGCTGCGCTTAAGTGCAGCGGTTGGTGGTGTCTGAGTGGGGGAGGGAGCCGACAAAGACCTGGGAGTGTGCTGGATCTCTCTATTCCAAAGG AGGTGTTTATACACGACTCGACATTTCTAAATTAACACACAGTGGAGTTACTTTACTACTATCTTTTGTCTGTTGGGGGAACGCTCTCTTTCGGGGGGGAGTCTCCCAAGTGGGA TGCAAAACAAACAAATATTTTTTAACTAATTCAGTCAACACAAGATTTCTTTAGTAGAAAACAACTTCAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCTCGCA
<i>Candida tropicalis</i> CIRM 204 bp	TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGATTGCTTAATTTGCTTAATTTGACCAACATGTGTTTTTTTATTTGAACAAATTTCTTTGGTGGCGGAGCAATCTACCGCCAGAGGTTATACTAA ACCAAACTTTTATTACAGTCAAACTTGATTTATTATTACAATAGTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATC
<i>Meyerozyma guilliermondii</i> CIRM 232 bp	TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACAGTATTTTGTCCAGCGCTTAAGTGCAGCGGCGAAAAACCTTACACACAGTGTCTTTTGTATACAGAACTTGTCTTTGGTTGGCCCT AGAGATAGGTTGGGCCAGAGGTTTAAACAAACACAATTTAATTTATTTTACAGTATGCAAAATTTTGAATTAATCTTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCA
<i>Millerozyma farinosa</i> CIRM 143 bp	TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAACATAATTTCTTACACACTGTTTTTTTACAACAAAAACAAATCTATCTAATCTATAAATCTACGTTTTTAAATCTTAAAACTTTCAAC AACGGATCTCTTGGTTCTCGCAT
<i>Kazachstania bulderi</i> CIRM 295 bp	TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAAATGATGAATCTGTTGGTAGGGAGAGCTGTTGAGCCTGCGCTTAAGTGCAGCGGTGAGGCTAGTTCTCTTCTGTTTAAACCGA TAAATCTTACACACTGGAGTTTTATTCTAGAGTATCGGGAGTAGCAATACCTCCAAAAACAAACACAAACAATTTCTTTTTTATTATTATTAATAGTCAATTTCAAAATCTGCTTTATT GCAGTAACCAAAATTTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCG
<i>Pichia kudriavzevii</i> CIRM 168 bp	TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGTGATTTAGTACTACACTGCGTGAGCGGAACGAAAAACAAACACCTTAAATGTGGAATATAGCATATAGTCGACAAGAGAAATCTA CGAAAAACAAACAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATC
<i>Candida humilis</i> CIRM 244 bp	TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAAATGATTGGGGAGCCCGCTGCGCTTACGTGCGCGGTGGCGTTCCACCTCTTACACACAGTGGAGTAATTAATCTTCTTGGGC CGAGCGTAAGCTCAGCTCGCCAAACACAAACAACTATTTCTATTATACAAATGTCATCAAACTGCTTACGAGTAACCAAAATATTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATC
<i>Candida humilis</i> 1 245 bp	TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAAATGATTGGGGAGCCCGCTGCGCTTACGTGCGCGGTGGCGTTCCGCTCTTACACACAGTGGAGTAATTAATCTTCTTGGGC TGGGCGAAAGTCCAGCTCGCCAAACACAAACAACTATTTCTATTATACAGTGTCAATCTGCTTACGAGTAACCAAAATATTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCG
<i>Candida carpophila</i> CIRM 234 bp	TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACAGTATTTCTTGGCCAGCGCTTAAGTGCAGCGGCGAAAAACCTTACACACAGTGTCTTTTGTATACAGAACTCTTCTTGGTTGGCCCT AGAAATAGGTTGGGCCAGAGGTTTAAACAAACACAATTTAATTTATTTATTTGACAGTCAAAATTTGAATTAATCTTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATC
<i>Candida carpophila</i> Consensus 233 bp	TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAAATGATTGTTTACAGCTTTACGTTTAAACATATACAACTAACCAACTTAATTAATGTCAACAAACCAAAATCTTCAAACTTTCAAC AGAGATAGGTTGGGCCAGAGGTTTAAACAAACACAATTTAATTTATTTATTTGACAGTCAAAATTTGAATTAATCTTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCAT
<i>Pichia burtonii</i> CIRM 146 bp	TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAAATTAATGTTTACAGCTTTACGTTTAAACATATACAACTAACCAACTTAATTAATGTCAACAAACCAAAATCTTCAAACTTTCAAC AACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGA
<i>Hyphopichia pseudoburtonii</i> 1 157 bp	TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAAATTAACCTTACACACATGTTATGTATACAACCAACCTTAACTAATTTATGTCAACTAACTAAAACTCAAACTTTCAACAACGGAT CTCTTGGTTCTCGCATCGAAGAGAAATCTACGAAAAA

**Supplementary material 3:** Sourdough and CIRM sequences added in “ITS1 completed” database. Sequence ID, base pair number, ITS1 extracted sequence portion and sequence

SequenceID / bp number (ITS1 extracted seq)	sequence
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 2 152 bp (263-414)	GTGAATATAGGACGTCCAACCTTAAGTGGAGTCGGAACCTCTCAGCAAGAGAGCGCAACTCTATTCTATTAACACAAAGTCTATGAATGTATTAATTTTATAACAAAATA
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 1 361 bp (262-622)	AAGAAATTTAATAATTTTGAAATGGATTTTTTGTGTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTACTGGGCAAGAGACAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGGCTGCGCTTAAGTGC GCGGTCTTGCTAGGCTTGAAGTTCTTTCTTGCTATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTGTTATAGGAC AATTAAACCGTTTCAATACACACACTGTGGAGTTTTCATATCTTTGCAACTTTTCTTTGGGCAATCGAGCAATCGGGGCCAGAGGTAAACACAAACAATTTTATCTATTCAATTAATTTTGTCAAAAACAAGAAATTTTCTGTAAGTGAATTTTAAATATTAA
<i>Kazachstania exigua</i> CIRM 226 bp ( 263-488)	AAGAAATGATGAATAATTTGGTAGAGGAGGATGATCGAGCTGCGCTTAAGTGC GCGGAGGTGTTCTTTTCGTACGCCGATAATCTTTACACACACTGGAGTTTATTCTACAGTATCGGAGGTAGCAATACCGCCAAACAAACACAAACAATTTT ATTATTTTAATTTGTCATTTCAAAATCTGCTTTATGTCAGTAACCAAAATATTCA
<i>Kazachstania exigua</i> 2 218 bp ( 265-482)	AAGAAATTAATGAATTTCTGGCGGGAGATGTTTGCAGCTGCGCTTAAAGTGC GCGGCAAGCGGTGCTCCAATTCACGCTGGTATTCTTACACACTGTGGAGTATTTCTACTTTTATTATCGAGGCGCTGCGCTCAACACCAAAACACAAACAATCTA TTTTTATTTATACCTAGTCAAAACAAATCTGTCTGACAGTAACCAAAATATTCA
<i>Scheffersomyces stipitis</i> CIRM 187 bp ( 263-449)	CAGTATTTCTTTTGCAGCGCTTAAGTGC GCGGCAAAACCTTACACACAGTGTCTTTCTTTATAGAAACTATTGCTTTGGTCTGGCTCAGAAATGAGTTGGGCCAGAGGTTTACCAAACTCAATTTTATGAATTGTTATTTTATTAATTTGTCAATTTGTTGATTAATTTCAAAAACTTCA
<i>Candida parapsilosis</i> CIRM 149 bp ( 264-412)	CAGAATGAAAGTGCTTAAGTCATTTTTTCTTACACATGTGTTTTCTTTTTTGAAACTTTGCTTTGGTAGGCCCTCTATATGGGCGCTGCCAGAGATTAACTCAACCAATTTTATTAATGTCAACCGATTATTTAATAGTCA
<i>Torulospira delbrueckii</i> CIRM 293 bp (264-556)	GAGAAATCTATGAATGAAGTTAGAGGACGTCTAAAGATACTGTAAGAGAGGATCAGTTCAAGACGAGCGCTTAATGCGCGGTTGCGGCTTGGTTCGCTTTTGC GGAACATGTCTTTCTCGTTGTTAACTCTACTTCAACTCTCAACACTGTGGA GTTTCTACACAACTTTTCTCTTTGGGAAGATACGTCTTGTGCTGCTTCCAGAGGTGACAAACACAAACAATTTTATTTATTAATAAACAGTCAAAACCAATTCGTTATGAAATTAATAATTTT
<i>Kazachstania unispora</i> 2 257 bp (263-519)	TAGAAATATAATTTCTGCTTTGCTTTGGAGACACATACTGCCGAACAGCGCTTAAATGCGCGGTTTGGTGGGCTCTGTAGCTCAGTACAGTACTATTACACACTGTGGAGATTTATAATTTCTTTGTCATGCTTCTTTGGGCGAGCTTCGGCAGCCAGAGGTAACAAA CACAAACAATTTGTAATATTTTAAACCAAGTCAAAACAGAAATCCAGAAAGATTATCTTTTGTAAATATTAAACAAATATTCA
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> CIRM 183 bp (263-445)	TAGTATTTCTATTGCGAGCGCTTAATTTGCGCGGCGATAAACCTTACACACATGTCTAGTTTTTTGAACTTTGCTTTGGGTGGTGAGCTGGCTACTGCCCAAAGGTCTAAACACATTTTTTAAATGTTAAACCTTTTAAACCAATAGTCATGAAATTTTAAACAAAATTAATCTTCA
<i>Candida glabrata</i> CIRM 402 bp (264-665)	AAGAAATTAATTGATTGTCTGAGCTCGGAGAGACATCTCTGGGAGGACAGTGTAGACACTCAGGAGGCTCTAAATATTTTCTCTGCTGTGAATGCTATTTCTCTGCTGCGCTTAAGTGC GCGG TTGGTGGGTGTTCTGCAAGTGGGGGAGGGAGCCGACAAAGACCTGGGAGTGTGCGTGATCTCTATTCCAAGGAGGTGTTTATCACACGACTCGACACTTTCTAATTACTAC ACACAGTGGAGTTTACTTTACTACTATTCTTTTGTTCGTTGGGGGAACGCTCTCTTTGGGGGGGAGTTCTCCAGTGGATGCAACACAAACAATATTTTTTAACTAATTCAGTCAACACAAGATTTCTTTAGTAGAAAACAACTTCA CTGATTTGCTTAAATGCACACATGTGTTTTTATTGAACAAATTTCTTTGGTGGCGGAGCAATCTACGCCAGAGGTTATAACTAAACCAAACTTTTATTACAGTCAAACTTGATTATTATTACAATAGTCA
<i>Candida tropicalis</i> CIRM 138 bp (264-401)	
<i>Meyerozyma guilliermondii</i> CIRM 168 bp (265-432)	CAGTATTTCTTTGCCAGCGCTTAAGTGC GCGGCAAAACCTTACACACAGTGTCTTTTGTATACAGAACTCTGCTTTGGTTGGCTAGAGATAGGTTGGGCCAGAGGTTTAAACAAACACAATTAATTATTTTACAGTTAGTCAAATTTGAATTAATCTTCA
<i>Millerozyma farinosa</i> CIRM 78 bp (262-339)	ACATAATATTCTTACACACTGTTTTTTTACAACAAACAAATCTATCTAATCTATAAATCTACGTTTTTAAATTTCTTA
<i>Kazachstania bulderi</i> CIRM 228 bp (264-491)	AAGAAATGATGAATCGTTGGTAGGGGAGAGCTGGTTGAGCTGCGCTTAAAGTGC GCGGTGAGGCTAGTTCTCTCGTTTTAAACCGATAATCTTACACACACTGGAGTTTATTCTAGAGTATCGGGAGTAGCAATACTCCCAAAACAAACACAAACAATCTTTTATTATT TAATAGTCATTTCAAATCTGCTTATTGACAGTAACCAAAATATTCA
<i>Pichia kudriavzevii</i> CIRM 102 bp (267-368)	CTGTGATTTAGTACTACACTGCGTGAGCGGAACGAAAAACAACACCTAAATGTGGAATATAGCATATAGTCGACAAGAGAAATCTACGAAAAACAACA
<i>Candida humilis</i> CIRM 178 bp (265-442)	AAGAAATGATTGGGGGAGCCGCTGCGCTTAGCTGCGCGGTGGCGTTCACCTCTTACACACAGTGAGTAATTAATCTTCTTTGGGCCGAGCGTAAGTCTCAGCTCGCCAAACACAAACAATTTTCTATTATACAATGTCAATCTGCTTACGAGTAACCAAAATATTCA
<i>Candida humilis</i> 1 178 bp (265-442)	AAGAAATGATTGGGGGAGCCGCTGCGCTTAGCTGCGCGGTGGCGTCCGCTCTTACACACAGTGAGTAATTAATCTTCTTTGGCTGGGCGAAAGTCCAGCTCGCCAAACACAAACAATTTTCTATTATACAGTGTCAATCTGCTTACGAGTAACCAAAATATTCA
<i>Candida carpophila</i> CIRM 168 bp (265-432)	CAGTATTTCTTTGCCAGCGCTTAAGTGC GCGGCAAAACCTTACACACAGTGTCTTTTGTATACAGAACTCTGCTTTGGTTGGCTAGAGATAGGTTGGGCCAGAGGTTTAAACAAACACAATTAATTATTTTATTGATAGTCAAATTTGAATTAATCTTCA
<i>Candida carpophila</i> 168 bp (265-432)	CAGTATTTCTTTGCCAGCGCTTAAGTGC GCGGCAAAACCTTACACACAGTGTCTTTTGTATACAGAACTCTGCTTTGGTTGGCTAGAGATAGGTTGGGCCAGAGGTTTAAACAAACACAATTAATTATTTTATTGATAGTCAAATTTGAATTAATCTTCA
<i>Pichia burtonii</i> CIRM 78 bp (265-342)	AAAAATTAATTTTACAGCTTACGTTTAAACATATACAACCTAACTAATTTATGTCAACAACAACCAAAATCA
<i>Hyphopichia pseudoburtonii</i> 1 71 bp (268-338)	AAATATTACCTTACACACATGTTTATGTATACAACCAACCTTAACATAATTTATGTCAACTAACTAAATCA

**Supplementary material 4:** Alpha-diversity indexes (Chao1, Simpson, Shannon, Phylogenetic Diversity (PD) whole tree and observed species) whole tree and observed species)



**Supplementary material 5:** Comparison of the databases when conflicting assignments at the different level ranks; pairwise or ClustalW alignment with BioEdit software.

Discarding assignment when OTU were assigned						BioEdit		
Rank	OTU_ID	UNITE_only	UNITE_completed	ITS1_only	ITS1_completed	differences observed	species	conclusion
1	-	-	-	-	-			
2	-	-	-	-	-			
3	911	<i>Dothideomycetes</i>	<i>Dothideomycetes</i>	<i>Euratiomycetes</i>	-			
	289	<i>Dothideomycetes</i>	<i>Dothideomycetes</i>	<i>Euratiomycetes</i>	<i>Euratiomycetes</i>			
	1277	<i>Dothideomycetes</i>	<i>Dothideomycetes</i>	<i>Euratiomycetes</i>	<i>Euratiomycetes</i>			
	2287	-	<i>Dothideomycetes</i>	<i>Sordariomycetes</i>	-			
4	911	<i>Capnodiales</i>	<i>Capnodiales</i>	<i>Chaetothyriales</i>	-			
	1280	<i>Capnodiales</i>	-	<i>Pleosporales</i>	<i>Pleosporales</i>			
	289	<i>Capnodiales</i>	<i>Capnodiales</i>	<i>Eurotiales</i>	<i>Eurotiales</i>			
	2201	<i>Capnodiales</i>	<i>Capnodiales</i>	<i>Pleosporales</i>	<i>Pleosporales</i>			
	1277	<i>Capnodiales</i>	<i>Capnodiales</i>	-	<i>Chaetothyriales</i>			
	1060	-	<i>Capnodiales</i>	<i>Pleosporales</i>	<i>Pleosporales</i>			
	2287	-	<i>Capnodiales</i>	<i>Xylariales</i>	-			
5	911	<i>Teratosphaeriaceae</i>	<i>Teratosphaeriaceae</i>	<i>Herpotrichiellaceae</i>	-			
	172	<i>Pleosporaceae</i>	-	<i>Incertae sedis</i>	<i>Incertae sedis</i>			
	289	<i>Teratosphaeriaceae</i>	<i>Teratosphaeriaceae</i>	<i>Trichocomaceae</i>	<i>Trichocomaceae</i>			
	1600	<i>Incertae sedis</i>	<i>Incertae sedis</i>	<i>Pleosporaceae</i>	<i>Pleosporaceae</i>			
	2201	<i>Teratosphaeriaceae</i>	<i>Teratosphaeriaceae</i>	<i>Incertae sedis</i>	<i>Incertae sedis</i>			
	1277	<i>Teratosphaeriaceae</i>	<i>Teratosphaeriaceae</i>	-	<i>Herpotrichiellaceae</i>			
	573	-	<i>Pleosporaceae</i>	<i>Incertae sedis</i>	<i>Incertae sedis</i>			
6	1060	-	<i>Teratosphaeriaceae</i>	<i>Incertae sedis</i>	-			
	2287	-	<i>Teratosphaeriaceae</i>	<i>Xylariomycetidae</i>	-			
	911	<i>Capnobotryella</i>	<i>Capnobotryella</i>	<i>Exophiala</i>	-			
	289	<i>Capnobotryella</i>	<i>Capnobotryella</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>			
	2201	<i>Capnobotryella</i>	<i>Capnobotryella</i>	<i>Xenobotrysphaeria</i>	<i>Xenobotrysphaeria</i>			
	1277	<i>Capnobotryella</i>	<i>Capnobotryella</i>	-	<i>Exophiala</i>			
	1060	-	<i>Capnobotryella</i>	<i>Xenobotrysphaeria</i>	-			
7	2287	-	<i>Capnobotryella</i>	<i>Microdochium</i>	-			
	2477	<i>Candida_athensisensis</i>	<i>Candida_carpophila</i>	<i>Meyerozyma_sp_AL_V</i>	-	75NP + 2del; 4 SNP; no difference	<i>C. athensisensis</i> ; <i>Meyerozyma sp</i> ; <i>C. carpophila</i>	the best = UNITE_completed
	628	<i>Candida_boleticola</i>	-	<i>Candida_railenensis</i>	<i>Candida_railenensis</i>	15NP + 1DEL; minimum 65NP + DEL	<i>C. railenensis</i> ; <i>C. boleticola</i>	the best = ITS1 because lack of sequence in UNITE
	1820	<i>Aspergillus_conicus</i>	<i>Aspergillus_conicus</i>	<i>Aspergillus_sp_NRRL_145</i>	<i>Aspergillus_sp_M1071</i>	no difference, 1 SNP	<i>Aspergillus sp NRRL 145</i> ; <i>Aspergillus conicus</i>	the best = ITS1 because lack of sequence in UNITE
	289	<i>Capnobotryella_sp_MA_4775</i>	<i>Capnobotryella_sp_MA_4775</i>	<i>Aspergillus_sp_M1071</i>	<i>Aspergillus_sp_M1071</i>	4 SNP; not good aligned	<i>Aspergillus sp M1071</i> ; <i>Capnobotryella</i>	identique Aspergillus sp M1071 sauf 4 des 6 premiers nt de la séquence - très différentes de Capnobotryella
	911	<i>Capnobotryella_sp_MA_4775</i>	<i>Capnobotryella_sp_MA_4775</i>	<i>Exophiala_salmonis</i>	-	not good aligned		
	2201	<i>Capnobotryella_sp_MA_4775</i>	<i>Capnobotryella_sp_MA_4775</i>	<i>Xenobotrysphaeria_calamagrostidis</i>	<i>Xenobotrysphaeria_calamagrostidis</i>	no difference; not good aligned	<i>X. calamagrostidis</i> - <i>Capnobotryella</i>	the best = ITS1 because lack of sequence in UNITE
	1277	<i>Capnobotryella_sp_MA_4775</i>	<i>Capnobotryella_sp_MA_4775</i>	-	<i>Exophiala_salmonis</i>	not good aligned	<i>Exophiala salmonis</i> - <i>Capnobotryella</i>	problem in ITS1db = extrnal TS1 part in the reference sequence
	965	<i>Drechslera_triseptata</i>	<i>Drechslera_triseptata</i>	<i>Drechslera_sp_JTO396b</i>	<i>Drechslera_sp_JTO396b</i>	15 SNP + 1del; 32SNP + 1del	<i>Drechslera JTO396</i> ; <i>Drechslera triseptata</i>	the best = ITS1 because lack of sequence in UNITE
	1991	<i>Fusarium_poa</i>	<i>Fusarium_poa</i>	<i>Fusarium_sp_59_4</i>	<i>Fusarium_sp_59_4</i>	2DEL		both sequences with the exactly same sequence in ITS1db=> not good to discriminate
	242	<i>Fusarium_poa</i>	-	<i>Fusarium_sp_59_4</i>	<i>Fusarium_sp_59_4</i>	no difference		
	77	<i>Kazachstania_barnettii</i>	<i>Kazachstania_exigua</i>	<i>Kazachstania_barnettii</i>	<i>Kazachstania_exigua</i>	all reference sequences		
	244	<i>Kazachstania_barnettii</i>	<i>Kazachstania_exigua</i>	<i>Kazachstania_barnettii</i>	<i>Kazachstania_exigua</i>	35NP or del; > 10 SNP or del	<i>K. exigua</i> ; <i>K.barnettii</i>	the best = UNITE_completed and ITS1_completed
	502	<i>Kazachstania_barnettii</i>	<i>Kazachstania_exigua</i>	<i>Kazachstania_barnettii</i>	<i>Kazachstania_exigua</i>	35NP or del; > 10 SNP or del	<i>K. exigua</i> ; <i>K.barnettii</i>	the best = UNITE_completed and ITS1_completed
	544	<i>Kazachstania_barnettii</i>	<i>Kazachstania_exigua</i>	<i>Kazachstania_barnettii</i>	<i>Kazachstania_exigua</i>	35NP or del; > 10 SNP or del	<i>K. exigua</i> ; <i>K.barnettii</i>	the best = UNITE_completed and ITS1_completed
	746	<i>Kazachstania_barnettii</i>	<i>Kazachstania_exigua</i>	<i>Kazachstania_barnettii</i>	<i>Kazachstania_exigua</i>	35NP or del; > 10 SNP or del	<i>K. exigua</i> ; <i>K.barnettii</i>	the best = UNITE_completed and ITS1_completed
	837	<i>Kazachstania_barnettii</i>	<i>Kazachstania_exigua</i>	<i>Kazachstania_barnettii</i>	<i>Kazachstania_exigua</i>	35NP or del; > 10 SNP or del	<i>K. exigua</i> ; <i>K.barnettii</i>	the best = UNITE_completed and ITS1_completed
	1216	<i>Kazachstania_barnettii</i>	<i>Kazachstania_exigua</i>	<i>Kazachstania_barnettii</i>	<i>Kazachstania_exigua</i>	35NP or del; > 10 SNP or del	<i>K. exigua</i> ; <i>K.barnettii</i>	the best = UNITE_completed and ITS1_completed
	1472	<i>Kazachstania_barnettii</i>	<i>Kazachstania_exigua</i>	<i>Kazachstania_barnettii</i>	<i>Kazachstania_exigua</i>	35NP or del; > 10 SNP or del	<i>K. exigua</i> ; <i>K.barnettii</i>	the best = UNITE_completed and ITS1_completed
	1532	<i>Kazachstania_barnettii</i>	<i>Kazachstania_exigua</i>	<i>Kazachstania_barnettii</i>	<i>Kazachstania_exigua</i>	35NP or del; > 10 SNP or del	<i>K. exigua</i> ; <i>K.barnettii</i>	the best = UNITE_completed and ITS1_completed
	1733	<i>Kazachstania_barnettii</i>	<i>Kazachstania_exigua</i>	<i>Kazachstania_barnettii</i>	<i>Kazachstania_exigua</i>	35NP or del; > 10 SNP or del	<i>K. exigua</i> ; <i>K.barnettii</i>	the best = UNITE_completed and ITS1_completed
	1900	<i>Kazachstania_barnettii</i>	<i>Kazachstania_exigua</i>	<i>Kazachstania_barnettii</i>	<i>Kazachstania_exigua</i>	35NP or del; > 10 SNP or del	<i>K. exigua</i> ; <i>K.barnettii</i>	the best = UNITE_completed and ITS1_completed
	2226	<i>Kazachstania_barnettii</i>	<i>Kazachstania_exigua</i>	<i>Kazachstania_barnettii</i>	<i>Kazachstania_exigua</i>	35NP or del; > 10 SNP or del	<i>K. exigua</i> ; <i>K.barnettii</i>	the best = UNITE_completed and ITS1_completed
	2291	<i>Kazachstania_barnettii</i>	<i>Kazachstania_exigua</i>	<i>Kazachstania_barnettii</i>	<i>Kazachstania_exigua</i>	35NP or del; > 10 SNP or del	<i>K. exigua</i> ; <i>K.barnettii</i>	the best = UNITE_completed and ITS1_completed
	2631	<i>Kazachstania_barnettii</i>	<i>Kazachstania_exigua</i>	<i>Kazachstania_barnettii</i>	<i>Kazachstania_exigua</i>	35NP or del; > 10 SNP or del	<i>K. exigua</i> ; <i>K.barnettii</i>	the best = UNITE_completed and ITS1_completed
	2637	<i>Kazachstania_barnettii</i>	<i>Kazachstania_exigua</i>	<i>Kazachstania_barnettii</i>	<i>Kazachstania_exigua</i>	35NP or del; > 10 SNP or del	<i>K. exigua</i> ; <i>K.barnettii</i>	the best = UNITE_completed and ITS1_completed
	2749	<i>Kazachstania_barnettii</i>	<i>Kazachstania_exigua</i>	<i>Kazachstania_barnettii</i>	<i>Kazachstania_exigua</i>	35NP or del; > 10 SNP or del	<i>K. exigua</i> ; <i>K.barnettii</i>	the best = UNITE_completed and ITS1_completed
	2807	<i>Kazachstania_barnettii</i>	<i>Kazachstania_exigua</i>	<i>Kazachstania_barnettii</i>	<i>Kazachstania_exigua</i>	35NP or del; > 10 SNP or del	<i>K. exigua</i> ; <i>K.barnettii</i>	the best = UNITE_completed and ITS1_completed
	934	<i>Kazachstania_aerobia</i>	<i>Kazachstania_aerobia</i>	<i>Kazachstania_servazii</i>	<i>Kazachstania_servazii</i>	15NP + 1del; 8 SNP + 3del	<i>K. servazii</i> ; <i>K. aerobia</i>	the best = ITS1 because lack of sequence in UNITE
	520	<i>Saccharomyces_sp</i>	<i>Saccharomyces_cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces_cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces_cerevisiae</i>	3 SNP		
	2313	<i>Saccharomyces_sp</i>	<i>Saccharomyces_cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces_cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces_cerevisiae</i>	no difference; min 1del	<i>S.cerevisiae</i> from sourdough; <i>S. cerevisiae</i> and <i>S. sp</i> of db	the best = ITS1 or completed db because lack of sequence in UNITE_only
	2323	<i>Saccharomyces_sp</i>	<i>Saccharomyces_cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces_cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces_cerevisiae</i>	3DEL		
	310	<i>Saccharomyces_sp</i>	-	<i>Saccharomyces_cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces_cerevisiae</i>	25NP + 1DEL; more differences	one <i>S.cerevisiae</i> reference sequence from ITS1 db; other sequences	
	2822	<i>Saccharomyces_sp</i>	-	<i>Saccharomyces_cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces_cerevisiae</i>	25NP + 2DEL; more differences	one <i>S.cerevisiae</i> reference sequence from ITS1 db; other sequences	
	1060	-	<i>Capnobotryella_sp_MA_4775</i>	<i>Xenobotrysphaeria_calamagrostidis</i>	-	no difference; not good aligned	<i>X. calamagrostidis</i> ; <i>Capnobotryella</i> sequences	the best = ITS1 because lack of sequence in UNITE
	1373	-	<i>Fusarium_poa</i>	<i>Fusarium_sp_59_4</i>	<i>Fusarium_sp_59_4</i>	no difference		
	2079	-	<i>Fusarium_poa</i>	<i>Fusarium_sp_59_4</i>	<i>Fusarium_sp_59_4</i>	no difference		
	980	-	<i>Kazachstania_exigua</i>	<i>Kazachstania_barnettii</i>	<i>Kazachstania_exigua</i>	35NP or del; > 10 SNP or del	<i>K. exigua</i> ; <i>K.barnettii</i>	the best = UNITE_completed and ITS1_completed
	727	-	<i>Tilletiopsis_minor</i>	<i>Tilletiopsis_washingtonensis</i>	<i>Tilletiopsis_washingtonensis</i>	no difference	<i>T. washingtonensis</i>	ITS1db



**Supplementary material 6:** Comparison of the databases when conflicting assignments at the different level ranks; BLAST on non-redundant nucleotide NCBI database ([http://blast.st-va.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](http://blast.st-va.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)).

Rank	OTU_ID	Discarding assignment when OTU were assigned				NCBI blast		
		UNITE_only	UNITE_completed	ITS1_only	ITS1_completed	%entity of the % query sequence	species	conclusion
1	-	-	-	-	-			
2	-	-	-	-	-			
3	911	<i>Dothideomycetes</i>	<i>Dothideomycetes</i>	<i>Eurotiomycetes</i>	-	95% on 100% QS	<i>uncultured fungus</i>	No corresponding sequence in NCBI db
	289	<i>Dothideomycetes</i>	<i>Dothideomycetes</i>	<i>Eurotiomycetes</i>	<i>Eurotiomycetes</i>	96% on 72% QS	<i>uncultured fungus</i>	No corresponding sequence in NCBI db
	1277	<i>Dothideomycetes</i>	<i>Dothideomycetes</i>	<i>Eurotiomycetes</i>	<i>Eurotiomycetes</i>	98% on 73% QS	<i>uncultured fungus - uncultured Cladosporium</i>	No corresponding sequence in NCBI db
	2287	<i>Dothideomycetes</i>	<i>Dothideomycetes</i>	<i>Sordariomycetes</i>	-	98% on 79% QS	<i>Monographella lycopodia</i>	No corresponding sequence in NCBI db
4	911	<i>Capnodiales</i>	<i>Capnodiales</i>	<i>Chaetothyriales</i>	-			
	1280	<i>Capnodiales</i>	<i>Capnodiales</i>	<i>Pleosporales</i>	<i>Pleosporales</i>	99% on 100% QS / 98% on 100% QS	<i>uncultured Pleosporaceae / Atenaria triticiina</i>	uncultured strain
	289	<i>Capnodiales</i>	<i>Capnodiales</i>	<i>Eurotiales</i>	<i>Eurotiales</i>			
	2201	<i>Capnodiales</i>	<i>Capnodiales</i>	<i>Pleosporales</i>	<i>Pleosporales</i>	97% on 99% QS / 100% on 60% QC	<i>uncultured Pleosporaceae - Lewia infectoria / uncultured Pleosporaceae - fungus</i>	No corresponding sequence in NCBI db
	1277	<i>Capnodiales</i>	<i>Capnodiales</i>	<i>Chaetothyriales</i>	<i>Chaetothyriales</i>			
	1060	-	<i>Capnodiales</i>	<i>Pleosporales</i>	<i>Pleosporales</i>	99% on 100% QS / 98% on 100% QS	<i>uncultured Pleosporaceae - Lewia infectoria / Atenaria triticiina</i>	<i>Lewia infectoria</i>
5	2287	-	<i>Capnodiales</i>	<i>Xylariales</i>	-			
	911	<i>Teratosphaeriaceae</i>	<i>Teratosphaeriaceae</i>	<i>Herpotrichiellaceae</i>	-			
	172	<i>Pleosporaceae</i>	-	<i>Incertae sedis</i>	<i>Incertae sedis</i>	93% on 100% QS / 98% on 75% QS	<i>uncultured Pleosporaceae - Lewia infectoria / uncultured Pleosporaceae - Lewia infectoria</i>	No corresponding sequence in NCBI db
	289	<i>Teratosphaeriaceae</i>	<i>Teratosphaeriaceae</i>	<i>Trichocomaceae</i>	<i>Trichocomaceae</i>			
	1600	<i>Incertae sedis</i>	<i>Incertae sedis</i>	<i>Pleosporaceae</i>	<i>Pleosporaceae</i>	100% on 98% QS	<i>uncultured Ascomycota - uncultured fungus</i>	uncultured strain
	2201	<i>Teratosphaeriaceae</i>	<i>Teratosphaeriaceae</i>	<i>Incertae sedis</i>	<i>Incertae sedis</i>			
	1277	<i>Teratosphaeriaceae</i>	<i>Teratosphaeriaceae</i>	-	<i>Herpotrichiellaceae</i>			
	573	-	<i>Pleosporaceae</i>	<i>Incertae sedis</i>	<i>Incertae sedis</i>	93% on 100% QS / 99% on 68% QS	<i>uncultured Pleosporaceae - Lewia infectoria / uncultured Pleosporaceae - uncultured fungus</i>	No corresponding sequence in NCBI db
6	1060	-	<i>Teratosphaeriaceae</i>	<i>Incertae sedis</i>	-			
	2287	-	<i>Teratosphaeriaceae</i>	<i>Xylariomycetidae</i>	-			
	911	<i>Capnobotryella</i>	<i>Capnobotryella</i>	<i>Exophiala</i>	-			
	289	<i>Capnobotryella</i>	<i>Capnobotryella</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>			
	2201	<i>Capnobotryella</i>	<i>Capnobotryella</i>	<i>Xenobotryosphaeria</i>	<i>Xenobotryosphaeria</i>			
	1277	<i>Capnobotryella</i>	<i>Capnobotryella</i>	-	<i>Exophiala</i>			
7	1060	-	<i>Capnobotryella</i>	<i>Xenobotryosphaeria</i>	-			
	2287	-	<i>Capnobotryella</i>	<i>Microdochium</i>	-			
	2477	<i>Candida athensensis</i>	<i>Candida carpophila</i>	<i>Meyerozyma sp. AL_V</i>	-	99% on 100% QS / 100% on 82% QS	<i>Saccharomycetales sp - Saccharomycetaceae sp / C. athensensis</i>	<i>Saccharomycetaceae sp</i>
	628	<i>Candida baleticola</i>	-	<i>Candida railensis</i>	<i>Candida railensis</i>	99% on 97% QS / 95% on 100% QS / 99% on 61% QS / 99% on 59% QS	<i>uncultured fungus / Saccharomycetales sp / uncultured fungus / Candida sp.</i>	No corresponding sequence in NCBI db
	1820	<i>Aspergillus conicus</i>	<i>Aspergillus conicus</i>	<i>Aspergillus sp. NRRL_145</i>	<i>Aspergillus sp. NRRL_145</i>	99% on 100% QS	<i>uncultured fungus - Aspergillus sp</i>	
	289	<i>Capnobotryella sp. MA_4775</i>	<i>Capnobotryella sp. MA_4775</i>	<i>Aspergillus sp. M1071</i>	<i>Aspergillus sp. M1071</i>			
	911	<i>Capnobotryella sp. MA_4775</i>	<i>Capnobotryella sp. MA_4775</i>	<i>Exophiala salmonis</i>	-			
	2201	<i>Capnobotryella sp. MA_4775</i>	<i>Capnobotryella sp. MA_4775</i>	<i>Xenobotryosphaeria calamagrostidis</i>	<i>Xenobotryosphaeria calamagrostidis</i>			
	1277	<i>Capnobotryella sp. MA_4775</i>	<i>Capnobotryella sp. MA_4775</i>	-	<i>Exophiala salmonis</i>			
	965	<i>Drechslera triseptata</i>	<i>Drechslera triseptata</i>	<i>Drechslera sp. JTO396b</i>	<i>Drechslera sp. JTO396b</i>	96% on 100% / 99% on 75% QS	<i>Drechslera biseptata - D. erythraspila / D. dematioides</i>	No corresponding sequence in NCBI db
	1991	<i>Fusarium poae</i>	<i>Fusarium poae</i>	<i>Fusarium sp. 59_4</i>	<i>Fusarium sp. 59_4</i>	99% on 100% QS	<i>uncultured fungus - Cladosporium sp - Cl. Cladosporioides - Albugo laibachii - uncultured ascomycete - Mycosphaerellaceae</i>	several corresponding species sequences
	242	<i>Fusarium poae</i>	-	<i>Fusarium sp. 59_4</i>	<i>Fusarium sp. 59_4</i>	98% on 100% QS	<i>Fusarium poae</i>	<i>Fusarium poae</i>
	77	<i>Kazachstania barnettii</i>	<i>Kazachstania exigua</i>	<i>Kazachstania barnettii</i>	<i>Kazachstania exigua</i>	100% on 55% QS	<i>Fungal sp</i>	No corresponding sequence in NCBI db
	244	<i>Kazachstania barnettii</i>	<i>Kazachstania exigua</i>	<i>Kazachstania barnettii</i>	<i>Kazachstania exigua</i>	99% on 55% QS / 99% on 52% QS	<i>Fungal sp / Kazachstania sp.</i>	No corresponding sequence in NCBI db
	502	<i>Kazachstania barnettii</i>	<i>Kazachstania exigua</i>	<i>Kazachstania barnettii</i>	<i>Kazachstania exigua</i>	100% on 55% QS / 99% on 52% QS	<i>Fungal sp / Kazachstania sp.</i>	No corresponding sequence in NCBI db
	544	<i>Kazachstania barnettii</i>	<i>Kazachstania exigua</i>	<i>Kazachstania barnettii</i>	<i>Kazachstania exigua</i>	99% on 72% QS / 99% on 68% QS	<i>Fungal sp / Kazachstania sp.</i>	No corresponding sequence in NCBI db
	746	<i>Kazachstania barnettii</i>	<i>Kazachstania exigua</i>	<i>Kazachstania barnettii</i>	<i>Kazachstania exigua</i>	100% on 77% QS / 99% on 73% QS	<i>Fungal sp / Kazachstania sp.</i>	No corresponding sequence in NCBI db
	837	<i>Kazachstania barnettii</i>	<i>Kazachstania exigua</i>	<i>Kazachstania barnettii</i>	<i>Kazachstania exigua</i>	100% on 74% QS / 99% on 70% QS	<i>Fungal sp / Kazachstania sp.</i>	No corresponding sequence in NCBI db
	1216	<i>Kazachstania barnettii</i>	<i>Kazachstania exigua</i>	<i>Kazachstania barnettii</i>	<i>Kazachstania exigua</i>	99% on 55% QS / 99% on 53% QS	<i>Fungal sp / Kazachstania sp.</i>	No corresponding sequence in NCBI db
	1472	<i>Kazachstania barnettii</i>	<i>Kazachstania exigua</i>	<i>Kazachstania barnettii</i>	<i>Kazachstania exigua</i>	100% on 78% QS / 99% on 74% QS	<i>Fungal sp / Kazachstania sp.</i>	No corresponding sequence in NCBI db
	1532	<i>Kazachstania barnettii</i>	<i>Kazachstania exigua</i>	<i>Kazachstania barnettii</i>	<i>Kazachstania exigua</i>	100% on 71% QS / 99% on 67% QS	<i>Fungal sp / Kazachstania sp.</i>	No corresponding sequence in NCBI db
	1733	<i>Kazachstania barnettii</i>	<i>Kazachstania exigua</i>	<i>Kazachstania barnettii</i>	<i>Kazachstania exigua</i>	100% on 55% QS / 99% on 52% QS	<i>Fungal sp / Kazachstania sp.</i>	No corresponding sequence in NCBI db
	1900	<i>Kazachstania barnettii</i>	<i>Kazachstania exigua</i>	<i>Kazachstania barnettii</i>	<i>Kazachstania exigua</i>	100% on 60% QS / 99% on 57% QS	<i>Fungal sp / Kazachstania sp.</i>	No corresponding sequence in NCBI db
	2226	<i>Kazachstania barnettii</i>	<i>Kazachstania exigua</i>	<i>Kazachstania barnettii</i>	<i>Kazachstania exigua</i>	99% on 75% QS / 99% on 71% QS	<i>Fungal sp / Kazachstania sp.</i>	No corresponding sequence in NCBI db
	2291	<i>Kazachstania barnettii</i>	<i>Kazachstania exigua</i>	<i>Kazachstania barnettii</i>	<i>Kazachstania exigua</i>	100% on 52% QS / 99% on 52% QS	<i>Fungal sp / Kazachstania sp.</i>	No corresponding sequence in NCBI db
	2631	<i>Kazachstania barnettii</i>	<i>Kazachstania exigua</i>	<i>Kazachstania barnettii</i>	<i>Kazachstania exigua</i>	99% on 72% QS / 99% on 68% QS	<i>Fungal sp / Kazachstania sp.</i>	No corresponding sequence in NCBI db
	2637	<i>Kazachstania barnettii</i>	<i>Kazachstania exigua</i>	<i>Kazachstania barnettii</i>	<i>Kazachstania exigua</i>	99% on 61% QS / 99% on 58% QS	<i>Fungal sp / Kazachstania sp.</i>	No corresponding sequence in NCBI db
	2749	<i>Kazachstania barnettii</i>	<i>Kazachstania exigua</i>	<i>Kazachstania barnettii</i>	<i>Kazachstania exigua</i>	99% on 73% QS / 99% on 69% QS	<i>Fungal sp / Kazachstania sp.</i>	No corresponding sequence in NCBI db
	2807	<i>Kazachstania barnettii</i>	<i>Kazachstania exigua</i>	<i>Kazachstania barnettii</i>	<i>Kazachstania exigua</i>	99% on 72% QS / 99% on 68% QS	<i>Fungal sp / Kazachstania sp.</i>	No corresponding sequence in NCBI db
	934	<i>Kazachstania aerobia</i>	<i>Kazachstania servazii</i>	<i>Kazachstania servazii</i>	<i>Kazachstania servazii</i>	99% on 91% QS	<i>K. servazii</i>	No corresponding sequence in NCBI db
	520	<i>Saccharomyces sp</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99% on 100% QS	<i>Saccharomyces cerevisiae - uncultured fungus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	2313	<i>Saccharomyces sp</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100% on 100% QS	<i>Saccharomyces cerevisiae - uncultured fungus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	2323	<i>Saccharomyces sp</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99% on 100% QS	<i>Saccharomyces cerevisiae - uncultured eukaryote</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	310	<i>Saccharomyces sp</i>	-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99% on 100% QS	<i>Saccharomyces cerevisiae - uncultured Ascomycota</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	2822	<i>Saccharomyces sp</i>	-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99% on 100% QS	<i>Saccharomyces cerevisiae - uncultured Ascomycota</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	1060	-	<i>Capnobotryella sp. MA_4775</i>	<i>Xenobotryosphaeria calamagrostidis</i>	-			
	1373	-	<i>Fusarium poae</i>	<i>Fusarium sp. 59_4</i>	<i>Fusarium sp. 59_4</i>	100%id on 100% QS	<i>Fusarium poae</i>	<i>Fusarium poae</i>
	2079	-	<i>Fusarium poae</i>	<i>Fusarium sp. 59_4</i>	<i>Fusarium sp. 59_4</i>	99%id on 100% QS	<i>Fusarium poae</i>	<i>Fusarium poae</i>
	980	-	<i>Kazachstania exigua</i>	<i>Kazachstania barnettii</i>	<i>Kazachstania exigua</i>	99% on 62% QS / 99% on 58% QS	<i>Fungal sp / Kazachstania sp.</i>	No corresponding sequence in NCBI db
	727	-	<i>Tilletopsis minor</i>	<i>Tilletopsis washingtonensis</i>	<i>Tilletopsis washingtonensis</i>	100% on 57% QS	<i>T. washingtonensis</i>	No corresponding sequence in NCBI db



**Supplementary material 7:** BioEdit pairwise alignment of the *Rhodotorula mucilaginosa* sequences. Above: the sequence of sourdough strain cut with ITSx software; below: the sequence of the ITS1 database.

	10	20	150	160	170	180
R.mucilaginosa sourdough reference ITSx	GTGAATATA		ATTAAATTTTATAACAAAATA			
Rhodotorula_mucilaginosa ITS1db	GCGGAAGGATCATTAGTGAATATA		ATTAAATTTTATAACAAAATAAAACTTTCAACACG			

# Supplementary material 8: UNITE and ITS1 random sets used to measure specificity and sensibility

UNITE random set	ITS1 random set
Alternaria sp Ag2	Phyllosticta citricarpa [JQ397013] SH208633.06FU [refs]
Tephromela atra	Mycoasphaeria grandis [AY244405] SH23638.06FU [refs]
Capronia sp 94005a	Mycoasphaeria irregulata [EU882210] SH220693.06FU [refs]
Scleroderma laeve	Devriesia latravirens [JX15745] SH222467.06FU [refs]
Thanatephorus cucumeris	Aureobasidium pullulans var. melanogenum [FJ150886] SH105496.06FU [refs]
Ambispora fenicia	Sphaeloma erythrinea [JN943502] SH210165.06FU [refs]
Ceratocystis diversiconidia	Leptosticta sp EF 18 [JQ395504] SH196181.06FU [refs]
Thielavia subthermophila	Ampelomyces quisqualis [KC494280] SH222883.06FU [refs]
Aureobasidium pullulans var melanogenum	Alternaria eichthomiae [KC146356] SH224789.06FU [refs]
Cortinarius magicus	Tulasnella sp YN 2011 [KC584240] SH224903.06FU [refs]
Dermatocarpon luridum var xerophilum	Pleosporaceae sp MUT 4379 [KC339229] SH227215.06FU [refs]
Cortinarius magicus	Cladophialophora subtilis [FJ385273] SH017941.06FU [refs singleton]
Heteroderma obscurata	Exophiala bergii [EF025403] SH216360.06FU [refs]
Tomentella intiae	Herpotrichiellaceae sp KH00305 [GU017515] SH209753.06FU [refs]
Coriolopsis sp BRFM 1125	Aspergillus fumigatus [AB250779] SH199401.06FU [refs]
Boletus pruinatus	Aspergillus sp DY115 21 8 M4 [KF411579] SH231352.06FU [refs]
Chaetomium hispanicum	Dermatocarpon arenosax [EF014167] SH227867.06FU [refs]
Cortinarius jardiensis	Cordia solitaria [HE72150] SH219394.06FU [refs]
Clobria americana	Staphylotrichum sp Amy 4 [AB728536] SH234940.06FU [refs]
Rocella boryi	Trapielopsis glaucopile [AY600008] SH200792.06FU [refs]
Rhodocollybia laulaha	Cladonia gracilis subsp elongata [FJ536353] SH218497.06FU [refs]
Austroarmelia pseudorelicina	Cladonia pocillum [DQ530204] SH218496.06FU [refs]
Anaglyptia runcinata	Cirriaria jussifilii [JQ797521] SH236713.06FU [refs]
Transcheliella hypodermi	Lecanora sp KWS 6 [AB764072] SH190340.06FU [refs]
Phellodon brunneovivaceus	Parmelia coleae [GU979822] SH198782.06FU [refs]
Cortinarius aff celandii 2 FS 2012	Lecidea sp UCR1 [EU239328] SH229500.06FU [refs]
Chaenotheca brachypoda	Leptogium lichenoides [DQ466031] SH225523.06FU [refs]
Passalora sp CBS 113371	Lobaria quercizans [AF524922] SH193697.06FU [refs]
Gastrum quadrifidum	Lobaria parvula [GU570098] SH226598.06FU [refs]
Ceratocystis adiposa	Melittigera retifoveata [AY257888] SH210343.06FU [refs]
Hyphodiscus sp TO 104241	Caloplatea arctica [GU723418] SH206065.06FU [refs]
Pichia myanmarensis	Caloplatea sp 3 UA 2013 [KC179097] SH214008.06FU [refs]
Antarctomyces sp D101 3	Caloplatea sp Frolav 52 [KC849497] SH206052.06FU [refs]
Ceratocystis norvegica	Caloplatea sp JS 2010 [HM582164] SH190039.06FU [refs]
Alpova olivaceotinctus	Xanthomendoza trachyphylia [KC179143] SH214012.06FU [refs]
Candida laemsonensis	Umbilicaria antarctica [AJ431605] SH195402.06FU [refs]
Russula foetens	Umbilicaria semitensis [JQ764735] SH195412.06FU [refs]
Coprinellus disseminatus	Erysiphe viburni [AF238541] SH204923.06FU [refs]
Phaeosphaeropsis glaucopunctata	Podosphaera gunnerae [AB525924] SH194424.06FU [refs]
Cladophialophora sp 99003c	Neobulgaria alba [HM116745] SH224221.06FU [refs]
Amanita sp whetstoneae	Dermatium sp T20 [GU367897] SH240111.06FU [refs]
Entoloma haastii	Morchella frutitosa [JQ723021] SH239626.06FU [refs]
Ceratobasidium sp 2 MV 2011	Morchella sp Mes 15 [JQ322047] SH229149.06FU [refs]
Inocybe sp 1 SGT 2012	Parmelia sp PN 2010 [JQ723135] SH229976.06FU [refs]
Pseudocystophellaria cinnamomea	Mortierella echinosphaera [JX845422] SH216310.06FU [refs]
Inocybe rimos	Geosmithia lavendula [AJ697745] SH222487.06FU [refs]
Umbilicaria dendrophora	Marasmius epiphyllus [JN559755] SH196903.06FU [refs]
Metarhizium flavoviride var minus	Drechslera triseptata [JQ414229] SH226094.06FU [refs]
Aspergillus tanneri	Saccharomyces vini [DQ835506] SH217615.06FU [refs]
Xanthoria elegans	Hypocrea lixii [AF057642] SH211697.06FU [refs]
Batrachochytrium dendrobatis	Acronium rutillum [AB540580] SH240964.06FU [refs]
Gerronea strobiloides	Acronium zeae [EU887241] SH191576.06FU [refs]
Karowia subchalybaeans	Geosmithia lavendula [AM421104] SH225162.06FU [refs]
Hyphodontia aspera	Illyonectria liriodendri [DQ178163] SH217322.06FU [refs]
Myccena pearsoniana	Illyonectria radiciicola [AJ677273] SH201351.06FU [refs]
Entoloma sericeum	Fusarium sp ES10 [DQ488297] SH217312.06FU [refs]
Boletus nobilissimus	Violtella sp DoF21 [JQ388266] SH225546.06FU [refs]
Tuber candidum	Ophiocordyceps sinensis [JX402624] SH188938.06FU [refs]
Saksenaia oblongispora	Polyphephalomyces profluvius [KF049660] SH200867.06FU [refs]
Melanoleuca arcuata	Colletochrym capici [JF749808] SH223482.06FU [refs]
Oreocina kerguelensis	Chaetomium sp MAB 2010a [H0829122] SH234918.06FU [refs]
Dactylella heptameris	Pestalotiopsis rhododendri [KC37804] SH210426.06FU [refs]
Collophora capensis	Diatrype disciformis [AJ302423] SH209822.06FU [refs]
Scleroderma sinnamariense	Hypoxylon cinnabarinum [AJ390398] SH219222.06FU [refs]
Coniothyrium sp JK27	Hypoxylon rickii [AJ390408] SH219221.06FU [refs]
Cortinarius camphoratus	Nemania abortiva [FJ172270] SH240860.06FU [refs]
Ponticulomyces orientalis	Ascomycta sp AR 2010 [HQ607821] SH197882.06FU [refs]
Biatora hertelii	Xylona heveae [JQ388232] SH210932.06FU [refs]
Montanella disjuncta	Leucoagaricus cupressus [GU136192] SH220925.06FU [refs]
Entoloma subulicoryboides	Leucoagaricus orientiflavus [GU084261] SH191038.06FU [refs]
Marasmius crinis equi	Leucoagaricus proximus [JX13172] SH191487.06FU [refs]
Parmelia sp JNZ 2011	Tulostoma squamosum [DQ415732] SH194068.06FU [refs]
Acaulospora minuta	Aptosticta auriculatum symbiont S1 [AF079673] SH239252.06FU [refs]
Penicillium miczynskii	Leptotrichum sp BR039 [EF527316] SH239257.06FU [refs]
Asterophora lycoperdoides	Amanita citrina [UDB015534] SH193845.06FU [refs]
Cetrelia pseudoviveterium	Amanita frillaria [FJ375328] SH224635.06FU [refs]
Micromphale perforans	Pholiotina teneroides [JX968264] SH232468.06FU [refs]
Pleurostomophora richardsiae	Cortinarius alnetorum [UDB002798] SH232937.06FU [refs]
Cladosticta diversigen	Cortinarius haasii [UDB001951] SH201766.06FU [refs]
Didymosphaeria sp TS 04 050	Cortinarius nebulosus [G0890307] SH001890.06FU [refs singleton]
Penicillium shearii	Cortinarius salor [UDB001175] SH213954.06FU [refs]
Myccena sp MLB 2010a	Cortinarius varius [UDB018643] SH191908.06FU [refs]
Fusarium sp Vega685	Cortinarius veronicoides [KC017362] SH191863.06FU [refs]
Monochaeta monochaeta	Cortinariaeae sp R3216 [EU422595] SH228241.06FU [refs]
Dasyscypha longistipitata	Entoloma subaraneosum [JQ320113] SH002010.06FU [refs singleton]
Hypocrea peltata	Gloioxanthomyces vitellinus [EU784355] SH209636.06FU [refs]
Entoloma omiense	Inocybe griseovelata [KC305453] SH201903.06FU [refs]
Tephrocbe palustris	Inocybe leucomela [GU980626] SH232326.06FU [refs]
Melanoxa oxalidifoliae	Gymnopus aquosus [JX536172] SH238286.06FU [refs]
Cryomyces antarcticus	Marasmiellus paspalii [EF175511] SH194092.06FU [refs]
Candida vaughaniae	Xeromphalina campanella [UDB015537] SH209007.06FU [refs]
Sterigmatomyces halophilus	Flammulina velutipes [DQ978220] SH240819.06FU [refs]
Candida boreocarinensis	Agrocbe erebia [FJ168567] SH191752.06FU [refs]
Dirina candida	Galerina marginata [AJ585497] SH210209.06FU [refs]
Rhizopus stolonifer var stolonifer	Clitocybe metachroa [UDB015736] SH193809.06FU [refs]
	Tricholoma sulphureum [AY462039] SH237348.06FU [refs]
	Tricholoma porphyrophylum [KC969668] SH209045.06FU [refs]
	Byssocorticium sp 1827 CG 2012 [HE814118] SH209894.06FU [refs]
	Boletus subappendiculatus [UDB000739] SH237164.06FU [refs]
	Octaviania nonae [JN257986] SH230609.06FU [refs]



## **Chapter 4:**

### **Exploration of the sourdough yeast strains phenotypical characteristics and of the relation between microbial community and baker practices.**

*(In prep.)*

Charlotte Urien<sup>1</sup>, Delphine Sicard<sup>2</sup> and Judith Legrand<sup>3</sup>

<sup>1</sup> INRA, UMR 0320/UMR 8120 Génétique Végétale, F-91190 Gif-sur-Yvette, France.

<sup>2</sup> INRA, UMR 1083 Sciences pour l'œnologie, 34060 Montpellier Cedex 2, France.

<sup>3</sup> Univ Paris-Sud, UMR 0320/UMR 8120 Génétique Végétale, F-91190 Gif-sur-Yvette, France.

## Résumé

La panification au levain est un processus complexe dont la technologie varie d'un boulanger à l'autre. Malgré l'impact des processus de panification sur la densité, la richesse spécifique et la compétition des espèces dans les levains, ces techniques sont peu décrites dans la littérature. Les communautés microbiennes et les processus de panification ont un impact sur les qualités organoleptiques du pain. Nous avons analysé la variabilité des processus de panification chez 14 boulangers produisant du pain au levain avec de la farine issue de l'Agriculture Biologique. La communauté microbienne, particulièrement celle de levures, et les paramètres biochimiques du levain associé à chaque boulanger ont également été caractérisés et mis en regard des pratiques. Deux typologies de processus de panification se distinguent : des processus plutôt « intensifs » et des processus plutôt « extensifs ». Les pratiques ont un impact sur la diversité des levures et notamment sur l'espèce *Candida humilis*, majoritaire dans les levains des boulangers aux pratiques plutôt « extensives ». Des souches isolées de levains et des souches de référence provenant d'autres environnements, appartenant à sept espèces de levure, ont été caractérisées phénotypiquement. Toutes les souches de levains naturels assimilent le raffinose et le saccharose, contrairement aux souches utilisées comme référence. La taille des cellules et la ploïdie sont positivement corrélées. Les souches isolées de boulangerie sont phénotypiquement plus proches entre-elles que des souches de référence. Cette étude met en évidence deux types des pratiques de panification. Elle souligne également l'impact des processus sur la composition en espèces de levure du levain, et suggère une convergence adaptative des levures des levains.

**Mots clefs:** diversité des pratiques de panification, diversité spécifique des levures, phénotypage des isolats, convergence adaptative au milieu levain.

## **Abstract**

Sourdough bread making practices are complex and vary from one baker to another. Despite the impact of bread-making processes on density, specific richness and competitiveness between the sourdough species, those techniques were poorly described in literature. Both microbial communities and bread-making processes affect bread organoleptic qualities. We analyzed variability of the bread-making processes carried out by 14 bakers producing organic sourdough bread. Microbial community, particularly the one of yeasts, and biochemical parameters of the bakers' sourdough were also characterized and analyzed taking into account bread-making processes. Two typologies of bread-making practices were distinguished: "intensive" and "extensive" processes. Bread-making practices impacted the yeast diversity and particularly the one of *Candida humilis* species which was dominant in the sourdoughs produced through « intensive » practices. Sourdoughs' isolated strains and reference strains isolated from other environments, belonging to seven species were phenotyped. All the sourdough strains assimilated raffinose and sucrose, unlike reference strains. Cell size and ploidy were positively correlated. Sourdough isolated strains were phenotypically more similar between them than to the reference strains. This study highlighted two types of bread-making practices. It also showed the impact of bread-making processes on the sourdough yeast composition and suggested the adaptive convergence of yeast in sourdoughs.

**Keywords:** bread-making practices diversity, yeast species diversity, isolates phenotypes, adaptive convergence of yeast in sourdoughs.

## 1. Introduction

Sourdough bread-making process practices can be described through many environmental and technical parameters such as flour cereal, sourdough age, temperature of sourdough fermentation, time of fermentation, sourdough fraction in the total dough weight, number of backslopping steps before sourdough use, salt quantity added to the sourdough per backslopping, baker's yeast addition in the sourdough (Lattanzi *et al.*, 2013; Lhomme, Urien *et al.*, (accepted); Minervini *et al.*, 2012; Roussel et Chiron, 2005; Scheirlinck *et al.*, 2007; Venturi *et al.*, 2012; Vrancken *et al.*, 2010). However, more studies need to be carried out to better describe bread-making process practices, and to analyze their effect on the pattern and process of sourdough microbe communities and vice versa. Sourdough microbial community is mainly composed by lactic acid bacteria (LAB) and yeast which fermented flour and sourdough sugars during fermentation process. Growth rate and yield of microorganisms are governed by a multitude of ecological factors in sourdough. Depending on the practices (flour, temperature, refreshment time), different yeast species appears to be selected for (Moroni *et al.*, 2011; Vogelmann *et al.*, 2009). First, flour cereal is known to affect yeast competitiveness (Moroni *et al.*, 2011; Vogelmann *et al.*, 2009). For instance, *Saccharomyces cerevisiae* appears to be less competitive than *Pichia kudriazevii* (previously called *Issatchenkia orientalis*) in quinoa (Vogelmann *et al.*, 2009). Intraspecific diversity also seems to change with flour. For instance, a higher genetic diversity of *S. cerevisiae* is maintained in sourdoughs made from organic rye flour than in sourdoughs made of conventional rye flour (Rosenquist et Hansen, 2000). Second, fermentation temperature affects abundance (Brandt *et al.*, 2004; Vrancken *et al.*, 2011) and dominant species (Meroth *et al.*, 2003b). A lower temperature (< 30 °C) promotes yeast growth while a higher temperature favor LAB and acidification (Meroth *et al.*, 2003a; Meroth *et al.*, 2003b). In addition, temperature affects yeast fitness. The yeast *Candida humilis* is selected for at lower temperature (25 °C), while the yeast *S. cerevisiae* appears to be selected for at 30 °C (Meroth *et al.*, 2003b). Growth ability also varies between species: *C. humilis* and *Kazachstania exigua* are not able to grow at 37 °C while *S. cerevisiae* can (Meroth *et al.*, 2003b ; Sugihara *et al.*, 1971; Valmorri *et al.*, 2010). The sourdough percentage as inoculum in the final bread dough increases the yeast density (Brandt *et al.*, 2004; Lattanzi *et al.*, 2013). Obviously, the yeast density in natural sourdoughs is also increased by addition of commercial yeast (Minervini *et al.*, 2012). Finally, salt may reduce *C. humilis* density (Simonson *et al.*, 2003). Microbial strains could compete for sugar resources available in sourdough matrix as suggested by the association between the maltose positive LAB *Lactobacillus sanfranciscensis* and the maltose negative yeast *C. humilis* particularly well identified in sourdough (Meroth *et al.*, 2003b; Salovaara et Savolainen, 1984; Sugihara *et al.*, 1971).

Through the fermentation, homofermentative lactobacilli produce lactate and/or acetate, ethanol and carbon dioxide whereas yeasts mainly produce ethanol and carbon dioxide. Both LAB and yeast

produce acidification of the dough and yeasts were particularly responsible of the leavened dough ability. Moreover, the sourdough's microbial community produces aroma contents (alcohols, aldehydes, diacetyl, acetoin and esters, (Birch *et al.*, 2013; Frasse *et al.*, 1993; Schieberle et Grosch, 1991) and reduce the negative effect of some metabolites (phytic acid for example) (Khetarpaul et Chauhan, 1990). Phenotypical descriptions of LAB and yeast strains allow understanding and highlight the role of each species of the community during fermentation process as well as its impact on the bread biochemical properties.

Diversity of sourdough yeast strains assimilation profiles of different sugars has been well-documented (Gullo *et al.*, 2003; Luangsakul *et al.*, 2009; Meroth *et al.*, 2003b; Sugihara *et al.*, 1971; Vigentini *et al.*, 2014). In *C. humilis* (together with *C. milleri*), a study on Italian sourdough, have found nine assimilation sugar's profiles among 17 strains (Vigentini *et al.*, 2014). All those strains were raffinose positive, mainly were sucrose and trehalose positives. *Candida humilis* is known to be maltose negative (Meroth *et al.*, 2003b; Vigentini *et al.*, 2014). In *Saccharomyces cerevisiae*, sourdough strains are usually able to assimilate maltose/galactose/trehalose (Meroth *et al.*, 2003b). *Kazachstania exigua* was previously described as glucose/galactose/sucrose positive (Sugihara *et al.*, 1971).

The aim of this study was i) to describe French traditional organic bread making practices to better understand which technical parameters vary from one baker to another, ii) to study the link between the bread-making practices and the microbial communities, iii) to describe assimilation profiles, ploidy level and sporulation ability of a collection of yeast strains including the ones isolated from French natural sourdough and reference strains obtained from collection. We choose to describe 28 sourdough strains and seven reference strains belonging to the seven most identified yeast strains in natural French organic sourdoughs (see chapters 1 and 2 of this manuscript): *C. humilis* and *S. cerevisiae* because they are known to be the major traditional sourdough yeast species; *Torulaspora delbrueckii* because this species is more distant in the phylogeny comparing to *Saccharomyces* and *Kazachstania* clades and *K. bulderi* because this species was recently isolated from French organic sourdough (Lhomme, Urien *et al.*, accepted).

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Bread-making practices**

A total of 14 bakeries located in distinct regions of France were selected, based on their choice to promote biodiversity conservation and to limit their ecological footprint through the use of natural sourdough and organic flour. A semi-structured interview co-developed with bakers and an ethno biologist to describe the bread-making practices was carried out among the 14 bakeries (questionnaire presented in Annex 1 of the Chapter 1). Fourteen characteristics were well



documented and retained from the semi-structured interview (Table 1): the baker status (farmer-baker or baker), the conservation temperature of the chief sourdough (room temperature/cold), the age in years of the chief sourdough, the origin/type of the chief sourdough (piece of dough/sourdough of the previous bread-making process), the percentage of sourdough added as inoculums to the bread dough, the kneading method (mechanical/manual), the number of days of bread-making process per week, the number of feeding between two bread-making processes, the origin of the water used along the bread-making process (tap/filtered), the flour origin (produced and milled in the bakery site or not), the wheat cultivar (wheat variety of the flour: modern/old or mix), the mill characteristics (millstone or cylinder) and the presence of commercial yeast in the bakery (yes or no).

**Table 1:** Baker practices description. Location: bakery location (SO = Southwest; SE = Southeast; NO = Northwest; NE = Northeast); SD = sourdough. SD conservation= conservation temperature of the chief sourdough (TA = room temperature; cold = in fridge or a room at a temperature lower than 7 °C); SD age = age of the sourdough; SD type = origin of the sourdough (dough = piece of dough of the previous bread-making process; sourdough = piece of sourdough of the previous bread-making process); % SD = percentage of sourdough as inoculums in the bread dough; kneading = method of kneading; BM nb/week = number of days of bread-making per week; Feeding nb= number of feeding during two bread-making process; water origin = origin of the water add during the bread-making process; flour origin = origin of the flour (own = flour produced and milled by the baker; miller = flour non produced and milled by the baker); wheat cultivar = wheat cultivar used as flour (modern = modern variety or varieties, old = old variety or varieties; mix = old and modern varieties mix); mill = mill characteristics; Baker yeast = use of commercial yeast in the bakery.

Baker ID	Baker status	Location	SD conservation	SD age (year)	SD type	% SD	kneading	BM nb/week	Feeding nb between BM	water origin	flour origin	wheat cultivar	mill	Baker yeast
1	farmer-baker	SO	TA	12	dough	43	mechanical	2	2	tap	own	mix	millstone	no
2	farmer-baker	SO	cold	<1	dough	16	mechanical	2	3	tap	own	old	millstone	no
3	farmer-baker	SE	cold	10	SD	15	manual	3	2	tap	own	old	millstone	no
4	baker	NO	cold	20	dough	33	mechanical	4	1	tap	miller	mix	NA	no
5	baker	NO	cold	20	SD	10	mechanical	6	1	tap	miller	NA	millstone	yes
6	baker	NE	cold	1	dough + SD	17	mechanical	6	1	tap	miller	modern	millstone	no
7	baker	NO	cold	29	dough	9	mechanical	4	1	filtered	miller	NA	NA	no
8	baker	NO	TA	33	SD	24	mechanical	7	1	filtered	miller	NA	millstone	yes
9	baker	NO	TA	2	dough + SD	18	mechanical	5	1	tap	own	modern	NA	yes
10	baker	SE	cold	13	SD	20	mechanical	6	2	tap	miller	NA	cylinder	no
11	baker	NE	cold	NA	SD	4	mechanical	7	4	tap	miller	NA	millstone	yes
12	farmer-baker	NO	TA	NA	dough	14	manual	2	2	filtered	own	old	millstone	no
13	baker	NE	cold	<1	dough	11	manual	1	3	tap	miller	old	millstone	no
14	baker	NE	TA & cold	>15	dough	2	mechanical	4	2	filtered	miller	modern	millstone	no

## 2.2.Sourdough collection and determination of pH, titratable acidity and organic acids

Samples were taken at final leavened dough step during the bread-making process. Two independent sourdough replicates were taken: at the center and at the surface of the sourdough sampled. All samples were kept at 4 °C for three to seven hours (for the bakeries 1 to 5) or at ambient temperature for 24 hours (for the bakeries 6 to 14) before analysis. Then, LAB and yeast were enumerated on triplicates for each sourdough replicate. Finally, LAB and yeast species were identified according to Lhomme, Urien *et al.*, (accepted, Chapter 2). Determination of pH, titratable

acidity and organic acid content was carried out for each sourdough sample according to Lhomme, Urien *et al.* (accepted, Chapter 2).

### **2.3. Analysis of bread-making practices**

To understand the links between the different technical parameters, we performed a multiple correspondence analysis (MCA). As the pattern of missing data may not be random, we considered the missing values as a class for each variable. We also performed Fisher exact test for all pairs of variables. To account for multiple testing, we adjusted p-value with the false discovery rate (FDR) method (Benjamini et Hochberg, 1995). We recoded quantitative variables as class variables as follows:

- The variable sourdough conservation was recoded in two classes: TA when sourdough was conserved at room temperature; cold when sourdough was conserved at cold temperature sometimes or always;
- The variable sourdough age was recoded into three classes: 1 for less than two years old; 10 between 2 and 10 years old; 20 when higher than 20 years old;
- The variable sourdough type was recoded in two classes: sourdough for the sourdough; dough for the dough and the mix of sourdough and bread dough;
- The variable sourdough percentage was recoded into three categories: 1 for less than 10 % of the final bread dough; 10 between 11 and 19 %; 20 when higher than 20 %;
- The variable number of bread-making days per week was recoded into three categories: 1 for one and two bread-making days per week; 3 for three and four bread-making days per week; 5 when higher than five bread making days per week;
- The variable feeding number between two bread-making processes was recoded into three categories: 1, 2 or 3 (when three or four feedings between two bread-making processes).

Mean of feeding per week was calculated and filed in two categories: 1 when less than seven feeding per week; 7 when more than seven feedings per week.

Following the MCA, we divided bakers into two groups. We compared those two groups regarding different practices using Fisher tests.

### **2.4. Analysis of sourdough properties and their link with bread-making practices.**

We compared three different mixed effect models to investigate the variations in  $\log_{10}$  of the yeast population densities according to the random effect baker (models 1, 2 and 3, Table 2), the fixed effect position of the sourdough sample (center or surface, model 3) or depending on the baker but not of the location in the dough (random effect Replicate, model 2) and the random effect bread making practices (two groups defined by the MCA, models 1, 2 and 3).

To study the relation between the microbial population densities and the biochemical properties of the sourdough, we performed a Principal Component Analysis (PCA) on the average values of the yeast and LAB population densities, the pH, the lactic acid and acetic acid contents and the TTA (Supplementary material 1). We analyzed the population densities on a  $\log_{10}$  scale and used only the observations of the sourdough center to build the PCA. The observations on the surface and of the bakery 14 (non-reproducible data) were used as supplementary individuals. To investigate the relation between bread making practices and the population densities and biochemical properties of the sourdough, we used the bread-making practices groups built from the MCA as a supplementary variable.

## **2.5. Phenotype analysis**

Phenotypic characterization of 35 yeast strains belonging to the seven dominant yeast species identified in French organic bread sourdoughs (*Candida humilis*, *Kazachstania bulderi*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii*, *K. barnettii*, *K. exigua* and *K. unispora*) was carried out. One reference strain supplied by CIRM-Levures collection and two to six strains isolated from French organic bread sourdoughs were analyzed per species (Table 2).

Seventeen strains were tested in two replicates for auxotrophy on synthetic minimum media (Table 2 column SD, glucose 2 % (ACROS Ref 410950010), Yeast Nitrogen Base w/o Amino acids and Ammonium sulfate 0.67 % (DIFCO Ref 233520), ammonium sulfate 0.5 % (MERCK Ref 1.01217.1000), agar 2 %) and on glycerol media (Table 2 column Gly, Bacto yeast extract 1 % (MOBIO Ref 12110-03), Bacto-pepetone 2 %, glycerol 3 %, agar 2 % (mOBIO Ref 12112-1)). Isolates were observed after three days at 30 °C.

**Table 2 :** Strains and their phenotypic analysis. ID = strain login (CLIBxxx = strains provided by CIRM institute); origin = origin of the strain; SD = growth test on minimum media; Gly = growth test on glycerol media; SPO and MC = ascospore observation after growth on acetate sporulation media (SPO and MC for McClary media); API = analysis of the sugar assimilation profile; FACS = genome content comparison; cell size = measure of the cell size by flux cytometry.

ID	origin	species	SD	Gly	SPO	MC	API	FACS	cell size
CLIB 227 <sup>T</sup>	brewery	<i>S. cerevisiae</i>	x	x	x		x	x	x
B7_13	sourdough		x	x	x		x	x	x
B5r_TP2_12	sourdough		x	x	x		x	x	x
B1r_TP_33	sourdough		x	x	x		x	x	x
B9_2	sourdough								x
B10_L_8	sourdough							x	x
CLIB 230 <sup>T</sup>	NA	<i>T. delbrueckii</i>	x	x	x		x	x	x
B1_AC_26	sourdough		x	x	x		x	x	x
B1_LC_1	sourdough		x	x	x		x	x	x
B14_36	sourdough		x	x	x		x	x	x
B14_10	sourdough							x	x
B14_12	sourdough							x	
CLIB 596 <sup>T</sup>	maize silage	<i>K. bulderi</i>	x	x	x		x	x	x
B3_TP1_20	sourdough		x	x	x	x	x	x	x
B4_TP1_12	sourdough		x	x	x	x	x	x	x
B12_7	sourdough		x	x	x		x	x	x
B3_AC1_32	sourdough		x	x	x	x			x
B3r_TP1_1	sourdough							x	
B4r_TP1_1	sourdough							x	
CLIB1323 <sup>T</sup>	brewery	<i>C. humilis</i>	x	x	x		x	x	x
B5_AC1_19	sourdough		x	x	x	x	x		x
B7_1	sourdough		x	x	x	x	x	x	x
B8_10	sourdough		x	x	x		x	x	x
B5_TP1_20	sourdough					x		x	x
B6_2	sourdough							x	x
B11_1	sourdough							x	x
CLIB433 <sup>T</sup>	soft drink beverage	<i>K. barnettii</i>						x	x
B13_6	sourdough					x			x
B14_22	sourdough							x	
CLIB179 <sup>T</sup>	brewery	<i>K. exigua</i>						x	x
B1r_TP_1	sourdough					x		x	x
B2_TP1_4	sourdough					x		x	x
CLIB234 <sup>T</sup>	brewery	<i>K. unispora</i>						x	x
B2_AC_10	sourdough					x		x	x
B2_TP_8	sourdough							x	x

Carbohydrate assimilation ability was tested in triplicate on 16 strains (Table 2 column API) thanks to analytical profile index (API 20 C AUX, bioMérieux, Durham, USA). Assimilation profiles were observed at 48, 72 and 120 hours. Spore formation tests were performed in duplicate on SPO (Table 2 column SPO, potassium acetate 1 %, Bacto yeast extract 0.25 % (MOBIO Ref 12110-03), glucose 0.1 % (ACROS Ref 410950010), agar 2 % (mOBIO Ref 12112-1)) and McClary (Table 2 column MC) media on 17 and 10 strains, respectively. For SPO, spores were observed under the microscope after 15 and 76 days at 30 °C. Ploidy level was analyzed by flow cytometry for 31 strains (Table 2 column FACS). Cell size was measured for 31 strains (Table 2 column cell size) by flow cytometry. (Refer to Chapter 1 for more details about phenotypic methods).

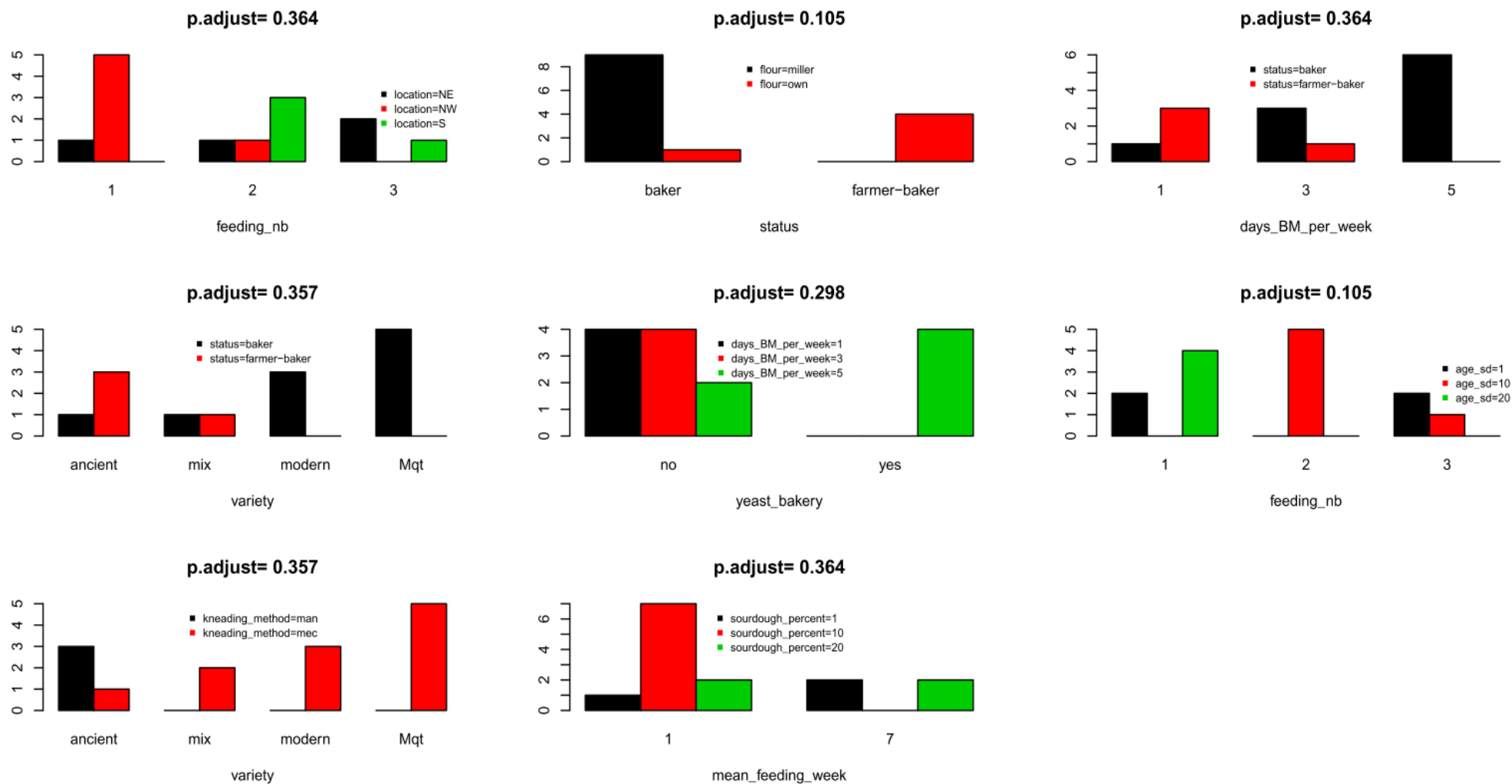
### 3. Results

#### 3.1. Diversity of natural sourdough bread making process

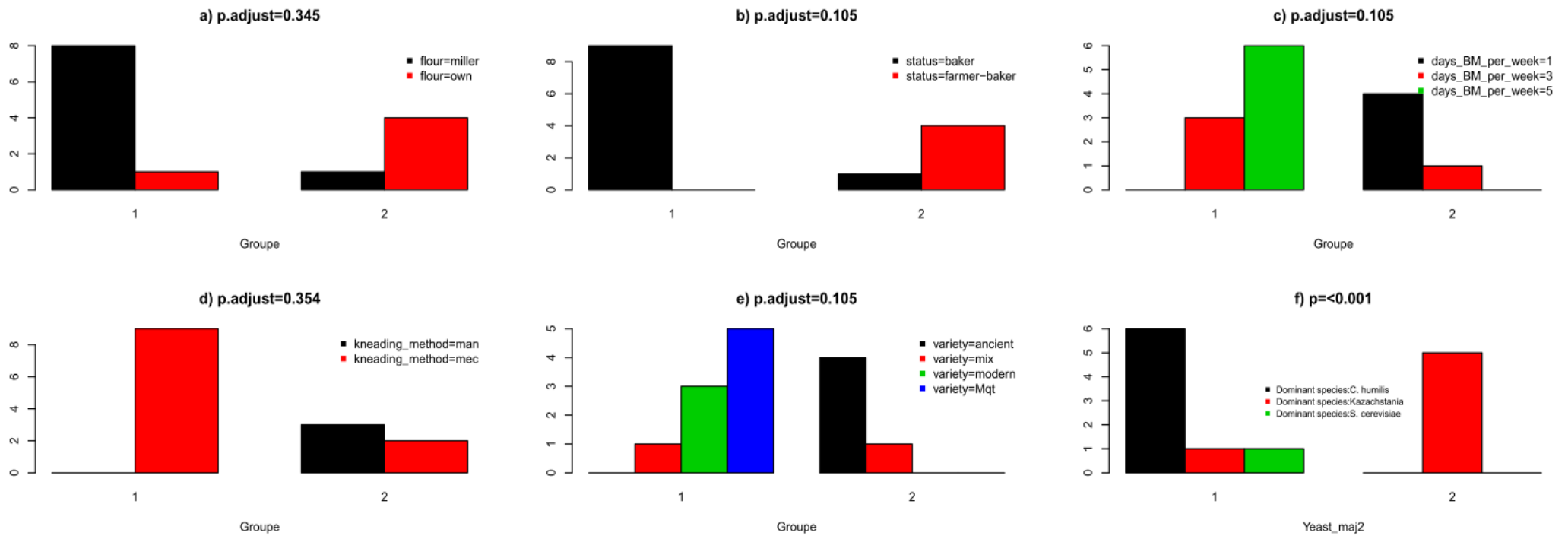
Four of the 14 bakers (29 %) were also farmers (Supplementary material 2 and Table 1). Sourdough was maintained at room temperature in four bakeries (29 %), at cold temperature in nine bakeries (64 %) and at cold or room temperature in one bakery (7 %). Sourdough age varied from a few months to 33 years. Chief sourdoughs were composed of a piece of sourdough in 36 % of the cases, of dough in 50 % of the cases or a mix of sourdough and dough from the previous bread-making run in the other cases. The percentage of sourdough in the dough varied from 4 to 43 % (mean = 16.9; SD = 10.9). One to seven days of bread-making process occurred per week (mean = 4.2; SD = 2.0). One to four feedings were done between two bread-making processes (mean = 1.9; SD = 0.9). The water used had tap origin in 10 cases (71 %) and was filtered in four cases (29 %). Flour was produced on site in 36 % (by the farmer-baker or the baker husband) and by an external miller in the other cases. The wheat cultivar was old in four bakeries (29 %), modern in three bakeries (21 %) and mix in two bakeries (14 %). This information was missing for 36 % of the bakeries. The mill used was more often millstone (71 %) than cylinder mill (7 %). This information was missing for 14 % of the bakeries. Finally, commercial yeast was used in four bakeries (29 %) for other bread products than the natural sourdough bread.

The MCA describe the relations between variables. The first axis highlights the link between the baker status, the origin and variety of the flour and the kneading method (Figure 1). Unsurprisingly, farmer-bakers use their own flour (100 % versus 10 % for bakers), bake ancient varieties (75 % versus 10 %), have less days of bread-making runs per week (2.25 versus 5) and use manual kneading more often than bakers (50 % versus 10 %). However, when performing exact independence test (Fisher exact test) between pairs of variables only the relation for the pairs represented on Figure 2 had a p-value greater than 5 % but none were significant when accounting for multiple testing. The second axis was more difficult to interpret and we decided to build a “practices” variable using coordinates on axis 1 only. The main practice differences were between bakers and farmer-bakers except for one baker (Baker 13) who has practices close to farmer-bakers ones. We have grouped this baker with farmer-bakers (Group 2) to study the impact of bread-making practices on yeast dominant species and densities in the dough as well as biochemical properties of the dough. All the other bakers are grouped in Group 1. The bread-making practices of the two groups are described in Figure 3.





**Figure 2:** Barplot representation of significant results of Fisher tests. Location = bakery location (NE = Northeast; NW = Northwest; S = South); feeding number =feeding number between two bread-making processes; status = baker's status (baker or farmer-baker); flour = origin of the flour (produced and milled in the bakery site (own) or not (miller)); days\_BM\_per\_week = number of bread-making process per week; variety = wheat cultivar (ancient = old; modern; mix = mix of modern and old varieties; Mqt = missing data); kneading method = manual (man) or mechanical (mec); sourdough percent = percentage of sourdough in the bread dough; mean feeding week = number of feeding per week; p= p-value adjusted with the false discovery rate method.



**Figure 3:** Barplot representation of the groups 1 and 2 according to the associated bread-making practices; flour = origin of the flour (produced and milled in the bakery site (own) or not (miller)); status = baker's status (baker or farmer-baker); days\_BM\_per\_week = number of bread-making process per week; kneading method = manual (man) or mechanical (mec); variety = wheat cultivar (ancient = old; modern; mix = mix of modern and old varieties; Mqt = missing data); dominant species = dominant species of the sourdough (*C. humilis* = *Candida humilis*; *Kazachstania* = *Kazachstania bulderi*, *K. barnettii*, *K. exigua* or *K. unisporea*; *S. cerevisiae* = *Saccharomyces cerevisiae*); p= p-value adjusted with the false discovery rate method.

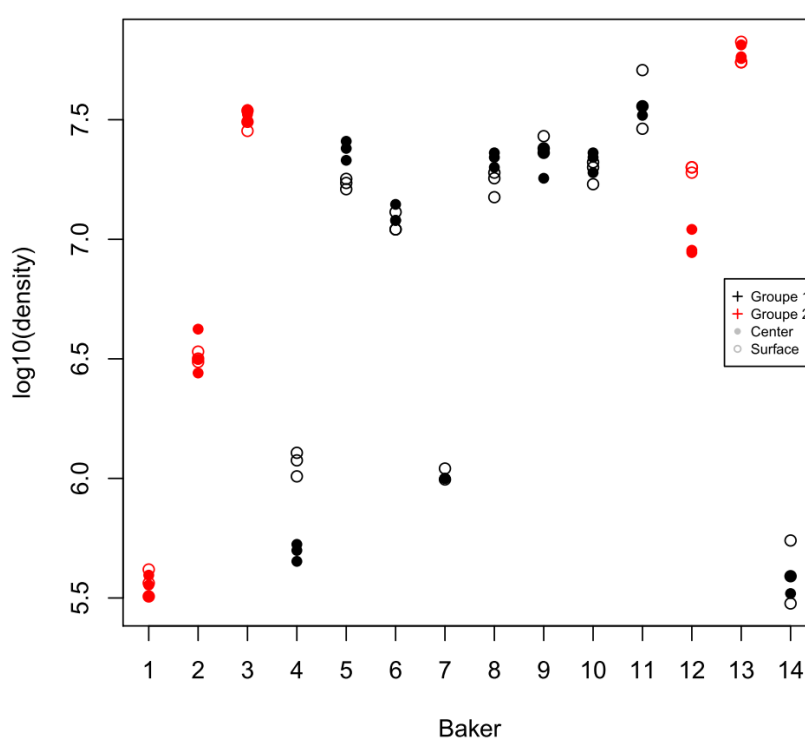


Figure 3 (a, b, c, d and e) presents the practices that were significantly related to the "Practices group" variable when using standard p-values. However, none of the Fisher tests were significant when using FDR adjusted p-values.

All bakers of Group 2 but one were farmer bakers. Most of them use their own flour (80 % versus 11 % for group 1, not adjusted p-value = 0.077), bake ancient varieties (80 % versus 0 % for group 1, not adjusted p-value = 0.023) have less days of bread-making runs per week and (80 % less than 2 versus 0 , not adjusted p-value = 0.023), use manual kneading (60 % versus 0, not adjusted p-value = 0.077).

### 3.2. Analysis of sourdough properties (dominant yeast species, population densities, biochemical properties) and their links with practices.

Variations of the yeast density according to the plate counted, the baker, the group and the dough replicate were investigated. Yeast density varied from  $10^{5.5}$  to  $10^{7.8}$  cells per gram of sourdough (Figure 4).



**Figure 4:** Log<sub>10</sub> of the yeast density (number of colonies per gram of sourdough) according to plates (point), the baker (1 to 14), the group (1 in black; 2 in red), the position of the replicate (center in plain; surface in empty).

Three models were tested to determine baker, group (determined with CMA), replicate and position of the replicate (center/surface) on the yeast density in  $\log_{10}$  (Tables 3 and 4). The yeast density was mainly affected by the baker effect (SD = 0.80). There was variations between different pieces of the same sourdough (SD = 0.09) but those variations are not related to the position in the sourdough (position factor in Model 3 was not significant, p-value = 0.086). There was no variation according to the group (p-value = 0.85).

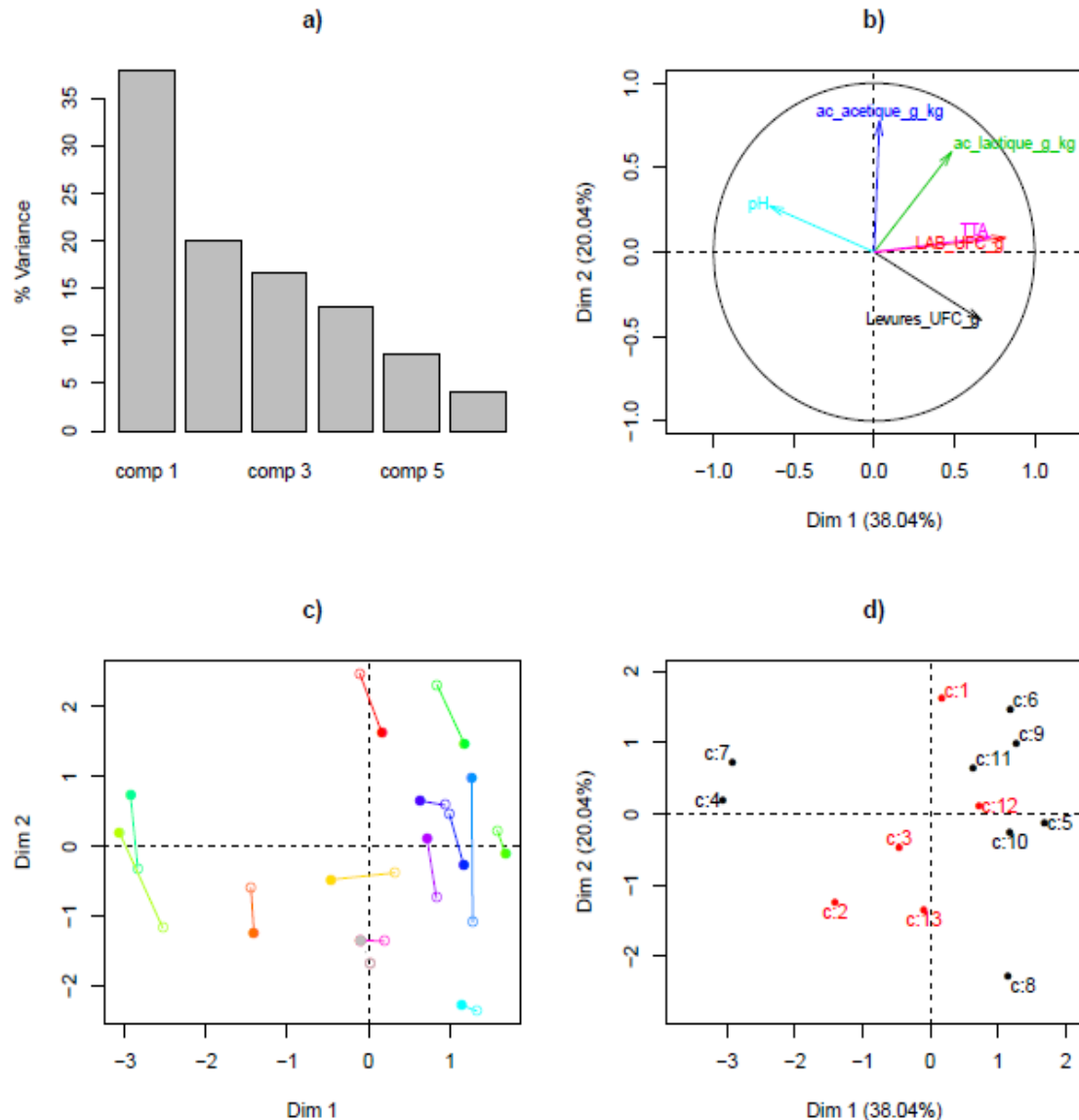
**Table 3 :** Akaike information criterion (AIC) results according to each model

Models		AIC
1	Group+(Baker)	-67.0
2	Group+(Baker/Replicate)	-103.8
3	Group +Position+(Baker)	-67.9

**Table 4 :** Akaike information criterion (AIC), variance or statistics value and p-value according to two models

Models	AIC	Variable	Variance	Stat.	p
Group + (Baker/Replicate)	-103.8	Group		0.036	0.850
		Baker	0.647		
		Replicate within	0.009		
		Baker			
Group + Position+(Baker)	-67.9	Group		0.036	0.850
		Position		2.957	0.086
		Baker	0.645		

Significant effect was detected for dominant species repartition among groups (p-value < 0.001, Figure 3f). In group 2 bakeries, non *C. humilis* *Kazachstania* species were exclusively identified as dominant yeast in sourdough whereas *C. humilis* was mainly identified as dominant species in group 1 sourdoughs. Less than two bread-making processes per week and using of old varieties were particularities of group 2 practices. More than five bread-making processes per week and *C. humilis* as dominant sourdough species were particularities of group 1 practices.



**Figure 5:** Principal component analysis: a) graphed eboullis ; b) Variable factors represented on the PCA first and second axis (one color per variable); c) Individuals represented on the PCA first and second axis (one color per baker; replicates sampled in the same sourdough linked: plain for center replicate; empty for surface replicate); d) Individuals represented on the PCA first and second axis (only center replicate; group 1 in black; group 2 in red).

A Principal Component Analysis (PCA) was performed in order to highlight the relationships between microorganism counts and biochemical properties of dough. LAB count, pH, TTA and Yeast count are well represented by the first axis explaining 38.04 % of the variance (Figure 5b). This axis separated sourdoughs with the less LAB counts (from the bakeries 4 and 7) from the other Group 1's sourdoughs (black points on the left separated from the right points, Figure 6d). Surface dough replicates were not used for the PCA analysis, they were relatively close to the center replicate (Figure 5c). Group 2's sourdoughs were closer compared to group 1's sourdoughs.

### 3.3. Phenotypic diversity of yeast strains isolated from natural French sourdoughs

Phenotypic characterization of 35 yeast strains belonging to the seven dominant yeast species identified in French organic bread sourdoughs (*Candida humilis*, *Kazachstania bulderi*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii*, *K. barnettii*, *K. exigua* and *K. unispora*) was carried out.

#### 3.3.1. Yeast metabolism

Auxotrophy and carbohydrate assimilation ability were analyzed on 16 to 17 strains belonging to *Candida humilis*, *Kazachstania bulderi*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii* species (Table 5). All the tested strains were able to grow on synthetic minimum (SD) media (Table 6) indicating they are all prototroph: all the strains are able to synthesize all they need for growth. All the tested strains except the *K. bulderi* strains were able to grow on glycerol media: *Saccharomyces cerevisiae*, *T. delbrueckii* and *C. humilis* strains were able to respire while *K. bulderi* was not able to respire on glycerol. All the tested strains assimilated glucose. This sugar is usually a positive control of assimilation. All the sourdough strains assimilated sucrose and raffinose even if the reference strain did not (*T. delbrueckii*, *C. humilis* and *K. bulderi* partially). *Saccharomyces cerevisiae* strain profiles were almost similar no matter strain origin. *Torulaspora delbrueckii* strain profiles were almost similar between sourdough strains but differ with the reference strain: they assimilated methyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside, maltose, trehalose and raffinose. *Kazachstania bulderi* sourdough strains were close to brewery reference strain except for raffinose. *Candida humilis* sourdough strains differed from brewery reference strain for the carbohydrate assimilations.

**Table 5:** Auxotrophy and carbohydrate assimilation results. Strain\_ID = strain login; status strain = status of the strain (reference = reference strain provided by the CIRM institute; sourdough = strain isolated in French organic bread sourdough); SD = growth test on synthetic minimum media; Gly = growth test on glycerol media; glu to raf = analysis of the sugar assimilation profile (glu = D-glucose, gly = glycerol, 2kg = calcium 2-ceto-gluconate, ara = L-arabinose, xyl = D-xylose, ado = adonitol, xlt = xylitol, gal = D-galactose, ino = inositol, sor = D-sorbitol, mdg = methyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside, nag = N-acetyl-glucosamine, cel = D-cellobiose, lac = D-lactose, mal = D-maltose, sac = D-sucrose, tre = D-trehalose, mlz = D-malazitose, raf = D-raffinose; sugar assimilation in one (v) or two (w) cases on the triplicats.

Strain_ID	status strain	species	SD	Gly	glu	gly	2kg	ara	xyl	ado	xlt	gal	ino	sor	mdg	nag	cel	lac	mal	sac	tre	mlz	raf
CLIB 227 <sup>T</sup>	reference	<i>S. cerevisiae</i>	+	+	+				w			+			+				+	+	+	+	+
B7_13	sourdough		+	+	+				w			+			+				+	+	+	+	+
B5r_TP2_12	sourdough		+	+	+							+			+				+	+	+	+	+
B1r_TP_33	sourdough		+	+	+				+		v	+			w		v		+	+	w		+
CLIB 230 <sup>T</sup>	reference	<i>T. delbrueckii</i>	+	+	+	w	+		v			+		+				w		w			
B1_AC_26	sourdough		+	+	+	+	+		+						+			+	+	+	+		+
B1_LC_1	sourdough		+	+	+	+	+		+						+			+	+	+	+		+
B14_36	sourdough		+	+	+	+	+		v			+			+			w	+	+	+		+
CLIB 596 <sup>T</sup>	reference	<i>K. bulderi</i>	+	-	+							+						v		+	v		
B3_TP1_20	sourdough		+	-	+							+								+	+		+
B4_TP1_12	sourdough		+	-	+							+						+	v	+	+		+
B12_7	sourdough		+	-	+							+								+	+		+
B3_AC1_32	sourdough		+	-																			
CLIB1323 <sup>T</sup>	reference	<i>C. humilis</i>	+	+	+							v											
B5_AC1_19	sourdough		+	+	+	+	+					+						v		+	+		+
B7_1	sourdough		+	+	+	w						+						v		+			+
B8_10	sourdough		+	+	+	v						+								+			+

### 3.3.2. Spore formation and genome content

Genome content and cell size were studied by flow cytometer for 31 strains (Table 6). In addition, twenty-two strains were tested for their ability to form ascospore on acetate media

Ploidy level (more precisely DNA content) was measured by flow cytometry by comparison to the haploid *S. cerevisiae* strain S288c and to the ploïdautotetraploïd *S. cerevisiae* strain Lev (commercial baker strains) (Albertin 2009). Ploidy level of the reference strains and of the sourdough strains varied from 1C to 5C (1C = one genome; 2C = two copies of the haploid genome; ...). The sourdough *S. cerevisiae* strains were either diploïd or tetraploïd strains. The tetraploïd sourdough strains were able to form spore while the diploïd sourdough strains were not. All the sourdough *T. delbrueckii* strains had 1C DNA content and therefore were not able to form spore. Sourdough strains from all the other species (*K. exigua*, *K. barnettii*, *K. unispora*, *K. bulderi*, *C. humilis*) had 2C DNA content. Except *K. bulderi*, which did not respire on glycerol and may not be able to respire on acetate (Table 5) and *C. humilis* which did not sporulate, all the other species were able to form spore, at least for some strains (Table 6).

Cell size of 31 strains was measured by flow cytometry. Cell size varied depending on the ploidy level from 3.14  $\mu\text{m}$  to 12.18  $\mu\text{m}$  (corr = 0.65,  $p < 0.0004$ ). For approximate content were defined: 1C, 2C, 3C and 5C, depending on the strain and the species. All the 5C belonged to *S. cerevisiae* species.

Ploidy level differ between reference strain and sourdough strains for 3 species: *T. delbrueckii*, *C. humilis* and *K. unispora*.

The *S. cerevisiae* reference strain isolated in brewery presented the same assimilation profiles, ploidy level and size order than two sourdough strains of this species. The *T. delbrueckii* reference strain presented different assimilation profiles and ploidy level than the sourdough strains of this species. The *K. bulderi* reference strain did not assimilate raffinose contrary to sourdough strains of this species. The ploidy level was the same between the reference and the sourdough strains. The *C. humilis* reference strain did not assimilate glycerol, sucrose and raffinose contrary to sourdough strains of this species and ploidy level also differed.

**Table 6:** Sporulation and flow cytometry results. SPO = ascospore observation after growth on acetate sporulation media; MC = ascospore observation after growth on McClary acetate sporulation media; Approximate DNA content = approximation based on the result presented in DNA content quantification measured by flow cytometer \* The DNA content was estimated at the G1 and G2 phase. The column gives the two values, classified by min and max.; cell size = cell size analyze by flow cytometer.

ID	origin	species	SPO	MC	Approximate DNA content	DNA content quantification *	Cell size
CLIB 227 <sup>T</sup>	brewery	<i>S. cerevisiae</i>	-		5C	5	10,52
B7_13	sourdough		+		5C	5 - 5,3	12,18
B5r_TP2_12	sourdough		+		<5C	4,5 - 4,6	11,47
B1r_TP_33	sourdough		-		3C	2,9 - 3,1	6,81
B9_2	sourdough						3,14
B10_L_8	sourdough				2C	2 - 2,3	5,65
CLIB 230 <sup>T</sup>	NA	<i>T. delbrueckii</i>	+		2C	1,3 - 1,6	7,28
B1_AC_26	sourdough		-		1C	0,6 - 1	7,88
B1_LC_1	sourdough		-		1C	0,3 - 0,7	8,31
B14_36	sourdough		-				8,55
B14_10	sourdough				1C	0,4 - 0,9	7,31
B14_12	sourdough						
CLIB 596 <sup>T</sup>	maize silage	<i>K. bulderi</i>	-		2C	1,6 - 2	3,28
B3_TP1_20	sourdough		-	-	2C	1,9 - 2,2	4,12
B4_TP1_12	sourdough		-	-	<2C	1,7 - 1,9	3,96
B12_7	sourdough		-		2C	1,7 - 2,1	4,37
B3_AC1_32	sourdough		-	-			4,03
B3r_TP1_1	sourdough				2C	1,6 - 2	
B4r_TP1_1	sourdough				2C	1,8 - 2,1	
CLIB1323 <sup>T</sup>	brewery	<i>C. humilis</i>	-		1C	0,8 - 1,3	4,85
B5_AC1_19	sourdough		-	-			5,36
B7_1	sourdough		-	-	2C	1,9 - 2,2	5,08
B8_10	sourdough		-		3C	3 - 3,3	5,32
B5_TP1_20	sourdough			-	2C	2,2 - 2,4	5,28
B6_2	sourdough				2C	1,8 - 2,1	4,80
B11_1	sourdough				2C	2,3 - 2,9	5,41
CLIB433 <sup>T</sup>	soft drink beverage	<i>K. barnettii</i>			1C	0,3 - 0,7	6,13
B13_6	sourdough			+			7,73
B14_22	sourdough						
CLIB179 <sup>T</sup>	brewery	<i>K. exigua</i>			2C	2,2 - 2,4	7,36
B1r_TP_1	sourdough			+	2C	1,9 - 2,2	4,10
B2_TP1_4	sourdough			-	<2C	1,6 - 1,9	3,63
CLIB234 <sup>T</sup>	brewery	<i>K. unispora</i>			1C	0,7 - 1	4,85
B2_AC_10	sourdough			+	2C	1,8 - 2,1	5,78
B2_TP_8	sourdough				2C	1,8 - 2	6,95

#### 4. Discussion

We investigate the variability of the bread-making practices in a sample of 14 bakeries. Despite the non significant of our results, the variability between the bread-making practices seems mainly explained by the status of the baker, the number of days of bread-making process per week, the origin of the milled flour, the wheat variety of the flour and the kneading method. Our results indicate two typologies of bread-making practices: one group with less intensive activity and more manual bread-making practices; one group with most intensive and more mechanical bread-making practices. More information like the fermentation temperature and salt quantity in the sourdough and the dough bread should be analyzing to complete the bread-making process typologies.

A link between the baker status and the dominant yeast species may exist and should be confirmed by increasing sampling. *Kazachstania bulderi*, *K. exigua*, *K. barnettii* and *K. unispora* were the dominant species in the farmer-baker's sourdoughs while *C. humilis* was never found in farmer-baker's sourdoughs. Except in the Baker 7's sourdough, all the *C. humilis* containing sourdoughs were produced by bakers, who make breads at least six days a week.

Each sourdough presented its own biochemical and microbial characteristics. Microbial density, particularly LAB ones, and acidity (TTA and pH) seems to be the most variable parameters between sourdoughs. Most variability of the biochemical and microbial characteristics was found between sourdoughs produced by group 1 bakers comparing to the group 2. Surprisingly, no relation was identified between LAB density and the lactic or acetic contents neither with pH or TTA whereas LAB were known to reduce the pH in the sourdough (Valmorri *et al.*, 2006).

*Candida humilis* was already described as yeast with no known sexuality (Kurtzman *et al.*, 2011). Assimilation profiles of *C. humilis* sourdough strains were closest with the *C. milleri* assimilation profile than with the *C. humilis* strains described in Vigentini (2014). Those species only differ by one substitution in the *D1/D2* rRNA gene and conspecificity is currently discussed (Kurtzman *et al.*, 2011). Complementary analyses have to be done to determine if the strains belong to *C. humilis* or *C. milleri* species, if they are considered as two different species. All the French organic sourdough yeast strains described in this study assimilated both sucrose and raffinose. Except in one study (Vigentini *et al.*, 2014) strains isolated from sourdough assimilating raffinose also assimilating sucrose (Luangsakul *et al.*, 2009; Meroth *et al.*, 2003b).

Cell size varied from one strain to another in sourdough and was positively correlated with DNA content. Into a species, size can quadrupled from one strain to another. Further analysis should be done to test if the cell size and the size of the yeast population are negatively correlated as suggested by Spor (2009). Biochemical differences between sourdough and reference strains suggest phenotypic convergence associated to sourdough adaption. All tested sourdough strains assimilated sucrose and raffinose. In the same way, a typical assimilation profile was found for the *T. delbrueckii*

sourdough strains in comparison to the reference strain. Further investigation has to be done to compare ploidy level and origin of the strain as suggested by our results.



## REFERENCES

- Albertin, W., P. Marullo, M. Aigle, A. Bourgeois, M. Bely, C. Dillmann, D. De Vienne, et D. Sicard. 2009. « Evidence for Autotetraploidy Associated with Reproductive Isolation in *Saccharomyces Cerevisiae*: Towards a New Domesticated Species ». *Journal of Evolutionary Biology* 22 (11): 2157-70. doi:10.1111/j.1420-9101.2009.01828.x.
- Benjamini, Y., et Y. Hochberg. 1995. « Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing ». *Journal of The Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 57 (1): 289-300.
- Birch, Anja N., Mikael A. Petersen, Nils Arneborg, et Åse S. Hansen. 2013. « Influence of commercial baker's yeasts on bread aroma profiles ». *Food Research International* 52 (1): 160-66. doi:10.1016/j.foodres.2013.03.011.
- Brandt, M. J., W. P. Hammes, et M. G. Ganzle. 2004. « Effects of Process Parameters on Growth and Metabolism of *Lactobacillus Sanfranciscensis* and *Candida Humilis* during Rye Sourdough Fermentation ». *European Food Research and Technology* 218 (4): 333-38. doi:10.1007/s00217-003-0867-0.
- Frasse, P., S. Lambert, D. Richard-Molard, et H. Chiron. 1993. « The Influence of Fermentation on Volatile Compounds in French Bread Dough ». *LWT - Food Science and Technology* 26 (2): 126-32. doi:10.1006/fstl.1993.1027.
- Gullo, M., A.D. Romano, A. Pulvirenti, et P. Giudici. 2003. « *Candida humilis*—dominant species in sourdoughs for the production of durum wheat bran flour bread ». *International Journal of Food Microbiology* 80 (1): 55-59. doi:10.1016/S0168-1605(02)00121-6.
- Khetarpaul, Neelam, et B.m. Chauhan. 1990. « Effects of Germination and Pure Culture Fermentation by Yeasts and Lactobacilli on Phytic Acid and Polyphenol Content of Pearl Millet ». *Journal of Food Science* 55 (4): 1180-1180. doi:10.1111/j.1365-2621.1990.tb01632.x.
- Kurtzman, Cletus, J. W. Fell, et Teun Boekhout. 2011. *The Yeasts: A Taxonomic Study*. Elsevier.
- Lattanzi, Anna, Fabio Minervini, Raffaella Di Cagno, Annamaria Diviccaro, Livio Antonielli, Gianluigi Cardinali, Stefan Cappelle, Maria De Angelis, et Marco Gobbetti. 2013. « The lactic acid bacteria and yeast microbiota of eighteen sourdoughs used for the manufacture of traditional Italian sweet leavened baked goods ». *International Journal of Food Microbiology* 163 (2-3): 71-79. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.010.
- Lhomme, E., C. Urien, J. Legrand, X. Dousset, B. Onnot & D. Sicard. Accepted. Sourdough microbial community dynamics: an analysis during French organic bread-making processes. *Food Microbiology*.
- Luangsakul, Naphatrapi, Suwimon Keeratipibul, Sasitorn Jindamorakot, et Somboon Tanasupawat. 2009. « Lactic Acid Bacteria and Yeasts Isolated from the Starter Doughs for Chinese Steamed Buns in Thailand ». *LWT - Food Science and Technology* 42 (8): 1404-12. doi:10.1016/j.lwt.2009.03.007.
- Meroth, C. B., J. Walter, C. Hertel, M. J. Brandt, et W. P. Hammes. 2003a. « Monitoring the Bacterial Population Dynamics in Sourdough Fermentation Processes by Using PCR-Denaturing

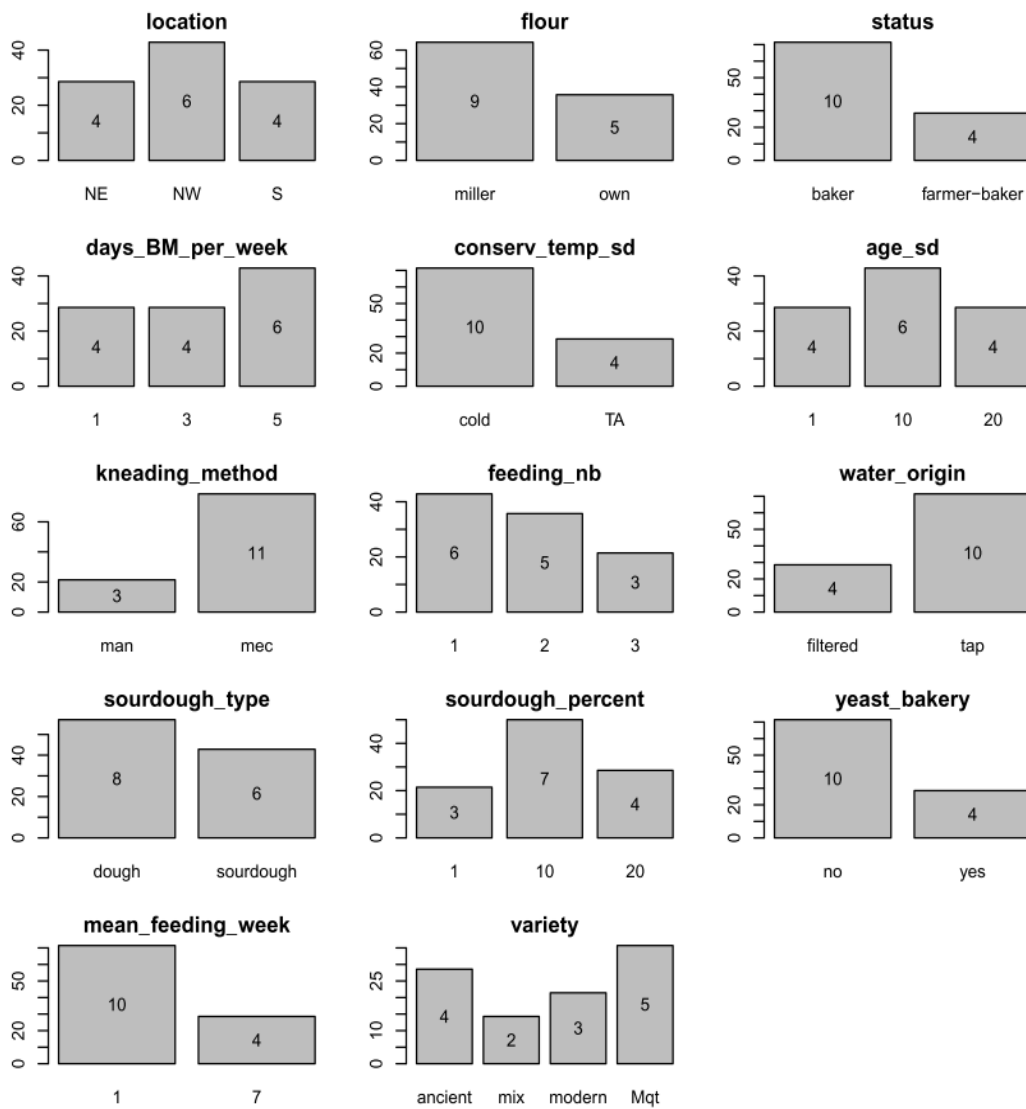
- Gradient Gel Electrophoresis ». *Applied and Environmental Microbiology* 69 (1): 475-82. doi:10.1128/AEM.69.1.475-482.2003.
- Meroth, Christiane B, Walter P Hammes, et Christian Hertel. 2003b. « Identification and population dynamics of yeasts in sourdough fermentation processes by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis ». *Applied and environmental microbiology* 69 (12): 7453-61.
- Minervini, Fabio, Raffaella Di Cagno, Anna Lattanzi, Maria De Angelis, Livio Antonielli, Gianluigi Cardinali, Stefan Cappelle, et Marco Gobetti. 2012. « Lactic Acid Bacterium and Yeast Microbiotas of 19 Sourdoughs Used for Traditional/Typical Italian Breads: Interactions between Ingredients and Microbial Species Diversity ». *Applied and Environmental Microbiology* 78 (4): 1251-64. doi:10.1128/AEM.07721-11.
- Moroni, Alice V., Elke K. Arendt, et Fabio Dal Bello. 2011. « Biodiversity of Lactic Acid Bacteria and Yeasts in Spontaneously-Fermented Buckwheat and Teff Sourdoughs ». *Food Microbiology* 28 (3): 497-502. doi:10.1016/j.fm.2010.10.016.
- Rosenquist, H., et A. Hansen. 2000. « The Microbial Stability of Two Bakery Sourdoughs Made from Conventionally and Organically Grown Rye ». *Food Microbiology* 17 (3): 241-50. doi:10.1006/fmic.1999.0313.
- Roussel, Philippe, et Hubert Chiron. 2005. *Les pains français : évolution, qualité, production (2° Ed.)*. Lavoisier. <http://www.lavoisier.fr/livre/notice.asp?ouvrage=2261627>.
- Salovaara, H., et J. Savolainen. 1984. « Yeast Type Isolated from Finnish Sour Rye Dough Starters ». *Acta Alimentaria Polonica*. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302040081>.
- Scheirlinck, Ilse, Roel Van der Meulen, Ann Van Schoor, Marc Vancanneyt, Luc De Vuyst, Peter Vandamme, et Geert Huys. 2007. « Influence of Geographical Origin and Flour Type on Diversity of Lactic Acid Bacteria in Traditional Belgian Sourdoughs ». *Applied and Environmental Microbiology* 73 (19): 6262-69. doi:10.1128/AEM.00894-07.
- Schieberle, Peter, et Werner Grosch. 1991. « Potent Odorants of the Wheat Bread Crumb Differences to the Crust and Effect of a Longer Dough Fermentation ». *Zeitschrift Für Lebensmittel-Untersuchung Und Forschung* 192 (2): 130-35. doi:10.1007/BF01202626.
- Simonson, Lauri, Hannu Salovaara, et Matti Korhola. 2003. « Response of wheat sourdough parameters to temperature, NaCl and sucrose variations ». *Food Microbiology* 20 (2): 193-99. doi:10.1016/S0740-0020(02)00117-X.
- Spor, Ayme, Thibault Nidelet, Jonattan Simon, Aurelie Bourgaïs, Dominique de Vienne, et Delphine Sicard. 2009. « Niche-Driven Evolution of Metabolic and Life-History Strategies in Natural and Domesticated Populations of *Saccharomyces Cerevisiae* ». *Bmc Evolutionary Biology* 9 (décembre). doi:10.1186/1471-2148-9-296.
- Sugihara, Tf, L. Kline, et Mw Miller. 1971. « Microorganisms of San Francisco Sour Dough Bread Process .1. Yeasts Responsible for Leavening Action ». *Applied Microbiology* 21 (3): 456 - &.
- Valmorri, Sara, Rosanna Tofalo, Luca Settanni, Aldo Corsetti, et Giovanna Suzzi. 2010. « Yeast Microbiota Associated with Spontaneous Sourdough Fermentations in the Production of

- Traditional Wheat Sourdough Breads of the Abruzzo Region (Italy) ». *Antonie van Leeuwenhoek* 97 (2): 119-29. doi:10.1007/s10482-009-9392-x.
- Valmorri, S., L. Settanni, G. Suzzi, F. Gardini, P. Vernocchi, et A. Corsetti. 2006. « Application of a Novel Polyphasic Approach to Study the Lactobacilli Composition of Sourdoughs from the Abruzzo Region (central Italy) ». *Letters in Applied Microbiology* 43 (3): 343-49. doi:10.1111/j.1472-765X.2006.01942.x.
- Venturi, Manuel, Simona Guerrini, et Massimo Vincenzini. 2012. « Stable and Non-Competitive Association of *Saccharomyces Cerevisiae*, *Candida Milleri* and *Lactobacillus Sanfranciscensis* during Manufacture of Two Traditional Sourdough Baked Goods ». *Food Microbiology* 31 (1): 107-15. doi:10.1016/j.fm.2012.02.011.
- Vigentini, Ileana, Davide Antoniani, Luca Roscini, Andrea Comasio, Silvia Galafassi, Claudia Picozzi, Laura Corte, et al., 2014. « *Candida Milleri* Species Reveals Intraspecific Genetic and Metabolic Polymorphisms ». *Food Microbiology* 42 (septembre): 72-81. doi:10.1016/j.fm.2014.02.011.
- Vogelmann, Stephanie A., Michael Seitter, Ulrike Singer, Markus J. Brandt, et Christian Hertel. 2009. « Adaptability of Lactic Acid Bacteria and Yeasts to Sourdoughs Prepared from Cereals, Pseudocereals and Cassava and Use of Competitive Strains as Starters ». *International Journal of Food Microbiology* 130 (3): 205-12. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.01.020.
- Vrancken, Gino, Luc De Vuyst, Roel Van der Meulen, Geert Huys, Peter Vandamme, et Heide-Marie Daniel. 2010. « Yeast Species Composition Differs between Artisan Bakery and Spontaneous Laboratory Sourdoughs ». *Fems Yeast Research* 10 (4): 471-81. doi:10.1111/j.1567-1364.2010.00621.x.
- Vrancken, Gino, Tom Rimaux, Stefan Weckx, Frederic Leroy, et Luc De Vuyst. 2011. « Influence of Temperature and Backslopping Time on the Microbiota of a Type I Propagated Laboratory Wheat Sourdough Fermentation ». *Applied and Environmental Microbiology* 77 (8): 2716-26. doi:10.1128/AEM.02470-10.

**Supplementary material 1:** PCA data. Baker\_ID = identification number of the baker; Group = group determined by MCA ; Rep = location of the sourdough replicate (c = center, s = surface); Yeast\_CFU\_g = number of yeast CFU per gram of sourdough; LAB\_CFU\_g = number of LAB CFU per gram of sourdough; lactic\_g\_kg = lactic acid content in gram per kg; acetic\_g\_kg = acetic acid content in gram per kg; TTA = total titratable acidity (mL NaOH 0.1 / 10g).

Baker_ID	Group	Rep	Yeasts_CFU_g	LAB_CFU_g	lactic_g_kg	acetic_g_kg	pH	TTA
1	2	c	5,55	9,21	6,99	0,66	3,79	16,43
1	2	s	5,57	9,16	7,00	0,81	3,84	15,50
2	2	c	6,53	8,46	3,47	0,67	3,79	16,43
2	2	s	6,51	8,41	4,27	0,68	3,84	15,40
3	2	c	7,52	8,99	5,28	0,64	3,92	12,00
3	2	s	7,50	9,04	5,29	0,67	3,84	16,00
4	1	c	5,69	7,81	4,47	0,73	3,91	12,60
4	1	s	6,07	7,77	4,32	0,56	3,80	13,50
5	1	c	7,37	8,49	5,86	0,70	3,61	25,67
5	1	s	7,23	8,23	6,14	0,79	3,46	22,60
6	1	c	7,10	8,98	5,56	1,00	3,66	19,87
6	1	s	7,07	9,28	5,52	1,14	3,74	16,43
7	1	c	6,00	7,74	4,23	0,85	4,00	16,17
7	1	s	6,02	7,88	4,83	0,55	4,06	15,77
8	1	c	7,34	8,96	4,44	0,49	3,56	19,97
8	1	s	7,24	8,99	4,81	0,42	3,56	20,77
9	1	c	7,34	9,25	5,10	0,94	3,76	21,30
9	1	s	7,39	9,35	5,05	0,57	3,73	20,00
10	1	c	7,33	9,07	5,05	0,72	3,73	21,97
10	1	s	7,29	8,91	4,98	0,85	3,77	23,30
11	1	c	7,54	9,10	5,20	0,84	3,91	20,00
11	1	s	7,59	9,10	5,40	0,83	3,84	20,00
12	2	c	6,98	9,23	4,68	0,71	3,95	26,00
12	2	s	7,29	9,18	3,99	0,65	3,96	28,40
13	2	c	7,78	8,80	4,64	0,61	3,83	15,17
13	2	s	7,77	8,88	5,35	0,50	3,86	15,77
14	1	c	5,56	8,58	3,58	0,60	3,54	24,63
14	1	s	5,62	8,72	4,25	0,47	3,54	21,97

## Supplementary material 2: Bread-making practices description



# DISCUSSION

1. Synthèse des résultats.....	208
2. Conservation de la biodiversité et microorganismes.....	210
3. Description de la diversité spécifique dans des levains naturels.....	211
4. Comparaison des méthodes culturales et non-culturales pour l'analyse de la diversité des levures.....	212
5. Les levains naturels français produits à partir de farine issue de l'Agriculture Biologique : une diversité particulière .....	213
5.1. Dominance des <i>Kazachstania</i> .....	213
5.2. Sous-représentation de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	215
5.3. Ploïdie des souches .....	215
5.4. Assimilation des sucres .....	216
5.5. Diversité des pratiques.....	217
6. Description de l'ensemble de la communauté microbienne du levain et étude des qualités organoleptiques du pain associé.....	218
7. La diversité des levures en panification : intérêts, avantages et perspectives associées.....	219
BIBLIOGRAPHIE.....	222

Afin de mettre en évidence l'originalité de cette thèse, les principaux résultats sont présentés, dans un premier temps, sous forme de tableaux. Ensuite, nous discuterons des résultats et des perspectives.

## 1. Synthèse des résultats

	Chapitre 2	Chapitre 3	Chapitre 4
Questions	Quelles est la <b>dynamique</b> des communautés microbiennes :	La <b>diversité spécifique</b> des levures est elle bien représentée via l'identification par <b>méthode culturale</b> ?	Quelle est la <b>diversité des pratiques de panification</b> des boulangers produisant du pain au levain produit à partir de farine issue de l'agriculture biologique?
	- au cours du processus de panification?		Quels facteurs structurent la diversité spécifique des levures?
	- d'une panification à une autre chez un même boulanger?	Est-il possible de décrire une plus grande diversité spécifique avec une <b>méthode non culturale</b> ?	Quelle est la diversité phénotypique des souches isolées des levains français :
			- entre elles? - par rapport à des souches de référence isolées d'autres environnements?
Matériel	Quatre prélèvements au cours de 2 processus de panification, dans 5 fournils	14 levains	14 questionnaires décrivant les pratiques de panification dans 14 fournils
	Au total : 520 colonies de LAB et 1 675 colonies de levures identifiées	Au total : 519 colonies isolées et 206 186 séquences ITS1 (Internal Transcribed Spacer) amplifiées	Analyses biochimiques, densité (LAB et levures) et espèce majoritaire de levures des levains décrits dans les chapitres 1 & 2
			28 souches de levains, 7 souches de références
Méthodes	Analyses culturales de la diversité	Analyses culturales de la diversité	Analyses statistiques pour mettre en lien les pratiques de panification à la diversité des communautés microbiennes
	Analyses biochimiques des levains	Analyses non-culturelles de la diversité par pyroséquençage 454	Caractérisation phénotypique : ploidie et taille des cellules par cytométrie de flux ; capacité à assimiler les métabolites carbonés (galeries API) ; auxotrophie (milieu SD), sporulation (milieu SPO et McClary)
	Analyses statistiques de la stabilité des communautés au cours du processus et entre processus de panification	Ajout de séquences à deux bases de données de références publiques	
		Comparaison de la composition des bases de données	
		Comparaison des résultats d'assignation selon la base de données	
Résultats principaux	Prédominance de <i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	Choix de la base de données "UNITE complétée", meilleures assignations que la base non complétée	Deux typologies de pratiques : plutôt "intensives" et plutôt "extensives"
	Diversité de l'espèce dominante de levures	Dominance des <i>Saccharomycetales</i> (63 % des séquences assignées) et particulièrement des <i>Kazachstania</i> (62 %)	Impact des pratiques sur l'espèce majoritaire : <i>Candida humilis</i> majoritaire exclusivement dans les levains produits à partir de pratiques plutôt "intensives"
	Variations de la densité des LAB et des levures au cours et entre processus de panification	Variation de la diversité alpha des levains	Souches de levains 2C à 5C (souches à 4C et 5C uniquement pour l'espèce <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )
	Espèces décrites :	Mêmes résultats d'identification de l'espèce majoritaire avec les méthodes culturale et non-culturelle	Souches de levains : assimilation saccharose et raffinose (convergence adaptative?)
	- 6 espèces LAB dont 1 majoritaire - 9 espèces levures dont 5 majoritaires	Description d'une plus grande partie de la communauté fongique avec la méthode non-culturelle	Reproduction théorique possible pour toutes les souches de <i>Kazachstania</i> isolées de levain, sauf <i>Kazachstania bulderi</i> (souches 2C de <i>Candida humilis</i> (ne sporulant pas) à comparer à une référence ayant le même contenu en ADN car espèce décrite comme exclusivement haploïde)
Perspectives	Etude de la diversité intraspécifique des souches de <i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> et de <i>Kazachstania</i>	Compléter les bases de données existantes pour améliorer l'assignation des séquences	Augmenter le nombre de boulangers enquêtés et décrire en parallèle les levains pour mettre en évidence des facteurs qui structurent la diversité des levains
	Description phénotypique des souches isolées		Comparer phénotypiquement des souches provenant de levains biologiques et de levains conventionnels
	Test de l'effet "farine biologique" comme réservoir de la biodiversité des levains	Comparer la diversité spécifique de levains biologiques et non biologiques	Faire en parallèle la description des souches de LAB pour avoir une vision globale du fonctionnement de la communauté microbienne du levain
	Description de la diversité des communautés microbiennes de levains produits à partir de farine conventionnelle pour comparaison		



Résultats complémentaires de l'analyse culturelle des 14 levains décrits dans les chapitres 3 et 4 pour les levures et les bactéries lactiques (LAB, identifications des LAB réalisées par Emilie Lhomme).

	Species names \ Baker ID	9	1	14	2	6	7	8	11	10	5	13	12	3	4
YEASTS	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>														
	<i>Kazachstania unisporea</i>														
	<i>Kazachstania exigua</i>														
	<i>Kazachstania bulderi</i>														
	<i>Kazachstania barnettii</i>														
	<i>Candida humilis</i>														
	<i>Torulasporea delbrueckii</i>														
	<i>Candida carpophila</i>														
LAB	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>														
	<i>Lactobacillus curvatus</i>														
	<i>Lactobacillus sakei</i>														
	<i>Lactobacillus plantarum</i>														
	<i>Lactobacillus pentosus</i>														
	<i>Lactobacillus kimchii</i>														
	<i>Lactobacillus hamessii</i>														
	no <i>Lactobacillus</i>														

**Tableau 1 :** Diversité des levures (yeasts) et des bactéries lactiques (LAB) identifiée par méthode culturelle dans 14 levains produits à partir de farine issue de l'agriculture biologique (Résultats associées aux chapitres 3 & 4). Nom de l'espèce (species name), identifiant du fournil (Baker ID, de 1 à 14) et fréquence de l'espèce dans le levain (de 0 à 1 ; en vert pour les levures, en orange pour les LAB ; le plus foncé correspondant à une fréquence plus élevée)

## 2. Conservation de la biodiversité et microorganismes

Il y a plusieurs années qu'une sirène d'alarme a été tirée pour faire face à la perte de la biodiversité sur notre planète. En effet, le taux actuel d'extinction des espèces, supérieur au taux géologique observé (Pereira *et al.*, 2010), nécessite la mise en place de mesures de conservation (Barnosky *et al.*, 2011). Les microorganismes, présents dans tous les environnements, ont un rôle fondamental dans l'écosystème auquel ils appartiennent. Les microorganismes, invisibles à l'œil nu et parfois non cultivables, ne reçoivent pas la même attention que les organismes visibles et dont l'extinction est facilement palpable pour tout être humain. Pourtant, les microorganismes sont la clef de bien des processus (digestion, dépollution des sols, libération de matière organique pour les plantes, fermentation des aliments, protection contre des pathogènes, ...) et permettent le maintien d'autres organismes sur terre via, notamment, leur activité dans les cycles du carbone et du nitrate (Brock et Madigan 1991). De plus, l'extinction de "macro-" organismes entraînerait l'extinction des microorganismes associés, spécifique à leur tube digestif par exemple : l'âne sauvage d'Afrique *Equus africanus* et particulièrement l'âne sauvage de Somalie (sous-espèce), actuellement "en danger critique d'extinction" (UICN, 2014) contient dans son tube digestif des champignons anaérobies spécifiques (Liggenstoffer *et al.*, 2010) : la disparition de l'hôte entraînerait l'extinction du microorganisme. À l'inverse, l'extinction d'une espèce microbienne ou d'un ensemble d'espèces microbiennes peut entraîner la disparition du "macro-" organisme associé : c'est le cas du blanchiment du corail avec la mort du microorganisme symbiotique associé (voir Rosenberg *et al.*, 2007 pour une revue sur les microorganismes associés aux coraux et leur rôle biologique) ou d'associations mycorhyziennes de certaines plantes dans le cas de symbiose obligatoire. Malgré la signature de la convention de la diversité biologique par 164 nations depuis 1992, réaffirmant que "la conservation de la diversité biologique est une préoccupation commune à l'humanité" (CDB, 1992), les efforts portés sur la conservation des microorganismes restent mineurs. Pour exemple, aucune espèce microbienne n'est inscrite sur la liste rouge de l'IUCN (plus de 20 000 espèces référencées comme menacées, UICN 2014). En 2012, Griffith a proposé de mettre en place une stratégie de conservation des microorganismes : "Global Strategy for Microbial Conservation" (Griffith 2012). Mais comment protéger une diversité microbienne méconnue et non cultivable?

En parallèle à la conservation des écosystèmes, il est primordial de décrire la diversité des microorganismes associée. Il s'agit là d'un travail titanesque quand on sait qu'une flaque d'eau résiduelle est elle-même un écosystème. Au cours de ce travail de thèse, nous avons choisi de décrire et conserver *ex situ* une partie de la communauté microbienne, la diversité des levures, d'un écosystème fermenté : le levain de panification.

### 3. Description de la diversité spécifique dans des levains naturels

Cette thèse a permis de faire un premier état des lieux de la diversité des levures dans les levains naturels français produits à partir de farine issue de l'Agriculture Biologique. La diversité des levures a été décrite jusqu'à l'espèce grâce à la microbiologie classique. Le développement d'une analyse non culturale par pyroséquençage d'amplicons a permis de décrire, à différents niveaux taxonomiques, la diversité des champignons et particulièrement des levures. Une première caractérisation de la diversité phénotypique de souches de levain a été réalisée au niveau intra et interspécifique et comparée à des souches de référence isolées d'autres environnements. Nous avons également décrit les pratiques de panification associées aux levains et mis en regard la diversité des communautés microbiennes à ces pratiques.

Dans un premier temps (Chapitre 2), la description au cours du processus de panification de l'ensemble de la communauté microbienne de levains provenant de cinq fournils a révélé la stabilité de la richesse spécifique au cours du processus de panification et, excepté dans un fournil, entre deux panifications. Pour les bactéries lactiques (LAB), l'espèce *Lactobacillus sanfranciscensis* a été identifiée dans tous les levains et était prédominante, alors que chaque fournil présentait sa propre diversité de levures et une espèce dominante spécifique au fournil (*Torulaspora delbrueckii*, *Candida humilis*, *Kazachstania unispora*, *K. exigua* ou *K. bulderi*). La densité des LAB, aussi bien que des levures, variait d'un processus de panification à un autre et au cours du processus de panification. Compte tenu de ces résultats, nous avons choisi le point de prélèvement "levain tout point" pour élargir l'analyse de la diversité des levains et des pratiques de panification associées. Sur un total de 14 levains, une méthode d'analyse non culturale de la diversité des champignons des levains a été développée en parallèle à la description de la diversité spécifique des levures par microbiologie classique (Chapitre 3). Deux bases de données (UNITE97 et ITS1) ont été complétées avec des séquences d'espèces ou de souches préalablement isolées dans des levains. La base de données UNITE97 complétée a été choisie pour assigner les séquences du pyroséquençage d'amplicons. Sur l'ensemble des séquences assignées, 63 % correspondaient à la famille des *Saccharomycetaceae* dont 62 % au genre *Kazachstania*. Nous avons mis en évidence la prédominance du clade des *Kazachstania* dans les levains naturels français produits à partir de farine issue de l'Agriculture Biologique. L'identification de l'espèce de levure qui domine dans le levain ne dépend pas de la méthode d'identification (culturale/non culturale). Enfin, nous avons montré que les levains produits par les paysans-boulangers avaient pour particularité de ne jamais avoir une flore levurienne dominée par l'espèce *C. humilis*, contrairement aux levains produits par des boulangers non paysans (Chapitre 4). L'analyse de la diversité phénotypique des souches isolées de levain, comparée à des souches de référence isolées d'autres environnements, a révélé que les souches de boulangerie

étaient diploïdes ou tétraploïdes, de taille variable et assimilaient le saccharose et le raffinose. Aucune structuration spatiale de la diversité des levures n'a été mise en évidence au cours de cette thèse.

#### **4. Comparaison des méthodes culturales et non-culturales pour l'analyse de la diversité des levures**

Les résultats obtenus par la méthode d'analyse non culturelle, par pyroséquençage, et par la méthode culturelle, par microbiologie classique de la diversité des champignons sont en adéquation concernant l'espèce dominante de champignons dans chaque levain. En nous affranchissant de la méthode culturelle, nous avons révélé une communauté fongique plus complexe que celle déterminée par microbiologie classique, avec au moins dix à 32 espèces par levains (19 espèces de *Basidiomycota* et 24 espèces d'*Ascomycota*). Aussi, avec cette technique, nous avons révélé la présence de séquences correspondant à de l'ADN de pathogènes de plantes (*Davidiella tassiana* (Capnodiales order), *Claviceps purpurea* (Hypocreales), *Fusarium poae* (Hypocreales), *Monographella nivalis* (Xylariales) et *Cryptococcus victoria* (Filobasidiales)), même si nous n'avons pu déterminer si ces organismes étaient vivants dans le levain ou s'il s'agissait uniquement d'ADN résiduel. En effet, ces pathogènes initialement présents dans la farine ont pu être évincés au cours du processus de maintien du levain par les souches de levures et de LAB fermentaires, alors plus compétitrices et produisant des composés possiblement toxiques pour les pathogènes initiaux (alcools par exemple).

L'analyse par pyroséquençage a l'avantage de s'affranchir de la phase de croissance des microorganismes sur un milieu de culture et permet donc de décrire à la fois les espèces cultivables et non cultivables d'un levain. Même si la méthode est « semi-quantitative », pouvant donc entraîner des variations d'abondance de séquences différant des abondances réelles, cela pourrait également être révélateur de la présence de souches ayant une valeur sélective plus faible dans le milieu levain que l'espèce majoritaire identifiée. De ce fait, l'analyse par méthode non culturelle et culturelle de la farine jusqu'à l'élaboration du levain chef permettrait de mettre en évidence la compétitivité des espèces et de mieux comprendre la mise en place de la communauté « fermentaire » du levain.

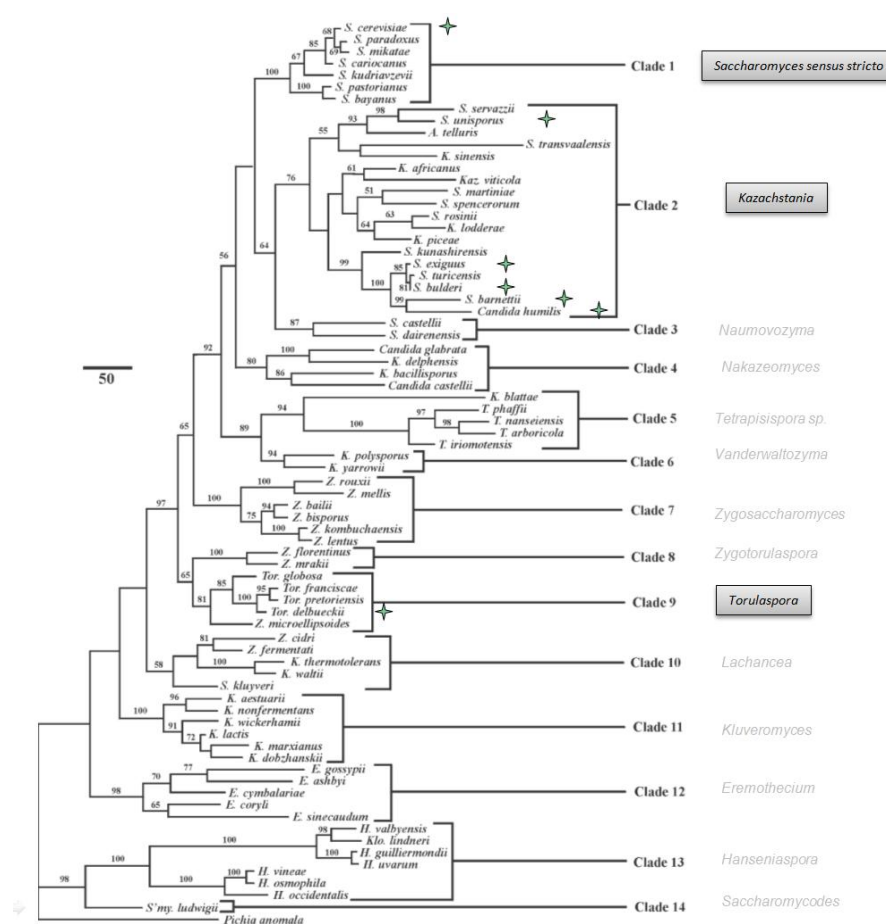
## 5. Les levains naturels français produits à partir de farine issue de l'Agriculture Biologique : une diversité particulière

Outre la prédominance des espèces du clade *Kazachstania*, ce travail met en évidence, dans les levains naturels français produits à partir de farine issue de l'Agriculture Biologique, la présence de souches à priori diploïdes, aneuploïdes et tétraploïdes (2 à 5C) assimilant toutes le saccharose et le raffinose.

### 5.1. Dominance des *Kazachstania*

Jusqu'à aujourd'hui, les levures des levains naturels étaient majoritairement identifiées comme appartenant à l'espèce *S. cerevisiae* ou à l'espèce *C. humilis* (seconde espèce la plus identifiée dans les levains naturels, voir intro, Figure 13). Cette thèse révèle une structuration particulière de la diversité des levures : une espèce de levures, propre à chaque levain et appartenant majoritairement au genre des *Kazachstania*, domine la communauté de champignons. Ces espèces sont : *Kazachstania exigua*, *K. barnettii*, *Candida humilis*, *K. unispora* et *K. bulderi* (voir les relations phylogénétiques entre ces espèces sur la Figure 1). Cette dernière n'avait jusqu'alors jamais été isolée dans des produits de panification. La dominance de l'espèce majoritaire perdure dans le temps, aussi bien au cours du processus qu'entre processus de panification, exceptée dans un fournil. Le changement de l'espèce dominante dans ce fournil pourrait être lié aux modifications des conditions climatiques entre les deux processus de panification. En effet, lors du premier échantillonnage (Février 2012), la température du fournil n'a jamais atteint plus de 8 °C : l'espèce dominante identifiée était alors *Torulaspora delbrueckii*. Or, cette espèce est connue pour sa résistance au froid (Hernandez-Lopez *et al.*, 2003), Sa valeur sélective devait être la meilleure dans les conditions de maintien du levain à des températures toujours inférieures à 10 °C. Entre les deux processus de panification étudiés, les saisons ont passé (second échantillonnage en Novembre 2012) et la température du fournil a varié : d'autres souches de levures, notamment de l'espèce *Kazachstania exigua* ont alors dû présenter une meilleure valeur sélective que *T. delbrueckii* qui a été évincée de la communauté (une seule séquence pour cette espèce avec l'analyse non-culturelle). L'analyse non culturelle a permis de décrire plus finement les populations de levures et confirme que chaque levain possède sa propre richesse spécifique en levures : aucune espèce n'a été identifiée dans tous les levains et une à dix espèces minoritaires, si on considère l'analyse comme étant semi-quantitative (Amend *et al.*, 2010), de *Saccharomycetales* ont été identifiées par levain. Sur l'ensemble des 14 espèces de *Saccharomycetales* assignées avec la base de données « UNITE complétée », plus de la moitié (8) appartiennent au genre des *Kazachstania*. De plus, 62 % des

séquences d'amplicons des levains naturels s'est révélé appartenir au genre des *Kazachstania*. L'espèce *Candida humilis* a été identifiée dans 12 des 14 levains naturels, bien qu'elle ne soit pas toujours dominante. Nous avons déterminé que la dominance de cette espèce était liée aux pratiques de panification (liée aux pratiques plutôt « intensives ») mais elle pourrait également être due à la dominance de souches de *Lactobacillus* maltose-positives telles que *L. sanfranciscensis* et à son association avec les souches de *C. humilis* maltose-négatives déjà mise en évidence dans des levains naturels (Brandt *et al.*, 2004 ; Ganzle *et al.*, 1998 ; Meroth *et al.*, 2003a ; Meroth *et al.*, 2003b ; Vogelmann et Hertel 2011). En effet, les deux levains issus de panifications plutôt « intensives » qui n'ont pas pour espèce dominante *C. humilis* n'ont également pas *L. sanfranciscensis* dominant la population de LAB (Tableau 1). Cependant, un des levains dominé par *C. humilis* ne possède pas non plus *L. sanfranciscensis* comme espèce dominante. Les relations entre les espèces, et particulièrement entre les espèces LAB et levures sont à approfondir sur un plus grand échantillon de levains.



**Figure 1 :** Proximité phylogénétique de sept espèces identifiées dans les levains naturels français produits à partir de farine issue de l'Agriculture Biologique (croix) et phylogénie des espèces appartenant au "complexe Saccharomyces" (un des trois arbres les plus parcimonieux, analyse des souches types, valeurs de bootstrap > 50 %, espèce outgroup : *P. anomala*, Extrait de Kurtzman et Robnett (2003).

## 5.2. Sous-représentation de *Saccharomyces cerevisiae*

L'espèce *S. cerevisiae*, communément appelée "levure de boulangerie", est commercialisée pour la fermentation du pain. Bien que de la "levure de boulangerie" soit utilisée pour d'autres produits de panification dans certains fournils, celle-ci ne semble pas avoir d'effet particulier sur la diversité spécifique des levures et, contrairement à une **hypothèse** largement avancée (Corsetti *et al.*, 2001 ; De Vuyst *et al.*, 2014 ; Meroth *et al.*, 2003 ; Pulvirenti *et al.*, 2001 ; Succi *et al.*, 2003 ; Vernocchi *et al.*, 2004 ; Vrancken *et al.*, 2010), ne coloniserait pas le milieu levain quand elle est utilisée dans le fournil. Cette espèce a bel et bien été identifiée par la méthode non culturale dans l'ensemble des fournils qui l'utilisent pour un autre produit de panification et a également été identifiée dans des levains de boulangers n'utilisant jamais de « levure de boulangerie ». Cependant, l'espèce *S. cerevisiae* ne domine qu'un des levains où l'espèce a été identifiée. La valeur sélective de la souche commerciale dans les levains naturels serait donc moins bonne que la valeur sélective des autres souches de levures présentes dans les levains naturels. L'espèce *S. cerevisiae* ne domine qu'un des levains où l'espèce a été identifiée : la valeur sélective de la souche commerciale dans les levains naturels est donc moins bonne que la valeur sélective des autres souches de levures présentes dans les levains naturels. Une analyse complémentaire menée par Lucie Huyghe (Stage Lucie Huyghe, master2, 2014) confirme nos résultats : dans un fournil où une souche commerciale est utilisée pour produire de la brioche, seule une souche isolée de levain sur 33 était génétiquement proche de la souche commerciale, sans invasion au cours du temps (prélèvements à un an d'intervalle). L'espèce *S. cerevisiae*, couramment utilisée par les industriels est donc suffisante mais non nécessaire pour produire du pain levé apprécié par le consommateur.

## 5.3. Ploïdie des souches

Sur les quatre souches de *S. cerevisiae* dont le niveau de ploïdie a été testé au cours de cette thèse, deux étaient tétraploïdes. L'une provient d'un fournil où une souche commerciale est utilisée pour un autre produit de panification, l'autre non. De plus, la description de souches de *S. cerevisiae*, isolées au cours de ma thèse à partir de levain ou qui proviennent de collection, a confirmé les résultats de Albertin *et al.* (2009) indiquant que les souches de boulangerie, aussi bien commerciales qu'isolées de levains naturels, étaient majoritairement tétraploïdes (Stage Lucie Huyghe, master2, 2014). Des résultats de génomique des populations sur une collection de souches de *S. cerevisiae* domestiquées suggèrent que les souches tétraploïdes de boulangerie sont des hybrides entre des souches de *S. cerevisiae* de saké et des souches de *S. cerevisiae* d'œnologie (Legras, comm. personnelle). Par ailleurs, on sait que certaines souches de brasserie sont des allotétraploïdes, et seraient issues d'hybridation entre *S. eubayanus* et *S. cerevisiae* (Dunn et Sherlock 2008). La polyploïdisation est un phénomène plus ou moins courant selon le type d'organismes et présente à la fois des avantages

(augmentation de la valeur hybride par rapport aux parents = hétérosis ; masquage des allèles récessifs et diversification de la fonction des gènes ; avantage pour reproduction asexuée) et des inconvénients (changement de l'architecture cellulaire ; difficultés en méiose et en mitose avec possible obtention d'aneuploïdes (3C) ; changement de régulation des gènes d'expression et instabilité épigénétique (voir Comai (2005) pour revue)). Il serait intéressant d'approfondir l'analyse des souches de *S. cerevisiae* des levains naturels pour comprendre quand a eu lieu l'évènement d'autotétraploïdisation (Albertin *et al.*, 2009) et confirmer qu'il est bien le fruit du processus de domestication de cette espèce. L'augmentation du niveau de ploïdie semble être accompagnée d'une augmentation de la taille chez *S. cerevisiae* mais davantage de souches diploïdes et tétraploïdes doivent être mesurées pour confirmer cette tendance. Il serait intéressant de tester si l'autotétraploïdisation des souches de boulangerie apporte un avantage sélectif et/ou un avantage boulanger dans l'environnement levain. Les souches *C. humilis* de levain ont été décrites comme des diploïdes mais cette espèce est connue pour ne pas avoir de reproduction sexuée et être haploïde. La diploïdie apparente des souches *C. humilis* de levain est probablement due au protocole de mesure par cytométrie de flux puisqu'elles ont été comparées à des souches de *S. cerevisiae* qui n'ont pas le même contenu en ADN originel. De plus, les souches *C. humilis* de levain n'ont pas produit de spore, ce qui confirme l'hypothèse d'une mesure erronée de la ploïdie.

#### 5.4. Assimilation des sucres

La farine de blé (ou de seigle) est composée d'une faible concentration de saccharose, formé d'une molécule de glucose et d'une molécule de fructose (0.6-1.8 %) et de raffinose, formé d'une molécule de galactose, d'une molécule de glucose et d'une molécule de fructose (0.1-0.4 % ; Gänzle 2014). Lors de la mise en place d'un levain de blé (ou de seigle), l'activité de l'amylase de la farine réduit l'amidon en maltose, maltodextrine et glucose (Gänzle 2014). Le maltose (deux molécules de glucose), le glucose et le fructose, produits par la conversion du saccharose par la glucane-saccharase de la farine, peuvent ensuite être métabolisés par les LAB et les levures. La farine est également composée de  $\beta$  glucanes, de pentosanes, d'arabinoxylanes et d'arabinogalactanes, fibres qui participent, quand elles sont solubles, à l'hydratation de la pâte grâce à la fixation de l'eau (Gänzle 2014 ; Roussel et Chiron 2005). Le métabolisme de ces sucres par les microorganismes affecte les qualités du pain (voir Goesaert *et al.*, 2005 pour revue).

Nous avons montré que l'ensemble des souches isolées de levain assimile le saccharose et le raffinose. Toutes les souches isolées de levain sauf deux souches de *C. humilis* assimilent le tréhalose (formé de deux molécules de glucose), et toutes les souches isolées de levain sauf deux souches de *T. delbrueckii* assimilent le galactose. Jusqu'à aujourd'hui, des souches isolées de levains ou de starters ont été décrites comme fermentant le saccharose (Luangsakul *et al.*, 2009 ; Sugihara *et al.*,



1971 ; Vigentini *et al.*, 2014 ; Meroth *et al.*, 2003) ou le saccharose et le raffinose (Luangsakul *et al.*, 2009 ; Vigentini *et al.*, 2014 ; Meroth *et al.*, 2003) mais aucune étude n'avait mis en évidence l'assimilation du saccharose et du raffinose par l'ensemble des souches décrites. Le tréhalose, isolé de levure de boulangerie en 1928 par Koch et ses collaborateurs (Stewart *et al.*, 1949) et dont la richesse intracellulaire apparaît comme un facteur de résistance au froid (Kandror *et al.*, 2004 ; Schade *et al.*, 2004), et le galactose sont souvent fermentés par les levures de levain ou de starter (Meroth *et al.*, 2003 ; Sugihara *et al.*, 1971 ; Vigentini *et al.*, 2014). Cependant, ils ne semblent pas être naturellement présents dans la farine ou les levains. Une analyse de la composition en sucre de la farine utilisée par les boulangers dont les levains ont été décrits au cours de cette thèse permettrait de comparer le contenu en glucides de la farine avec les farines déjà décrites dans la littérature. En effet, le son et la farine de blé n'ont pas la même composition en glucide : le son contient principalement de l'arabinose (37 % contre 10 % dans la farine), du xylose (27 % contre 8 % dans la farine) et du glucose (26 % contre 80 % dans la farine ; Nandini *et al.*, 2001). Selon le type de mouture, les proportions de sons contenus dans la farine varient fortement (Oury *et al.*, 2006 ; Khilberg *et al.*, 2004). Or, la farine était majoritairement de la T90 et de la T110 (mouture correspondant à un taux d'extraction moyens de la farine compris entre 84 et 90 %, Roussel & Chiron, 2005) alors que la farine généralement utilisée par les industriels contient un plus faible taux d'extraction de la farine (T55-T65).

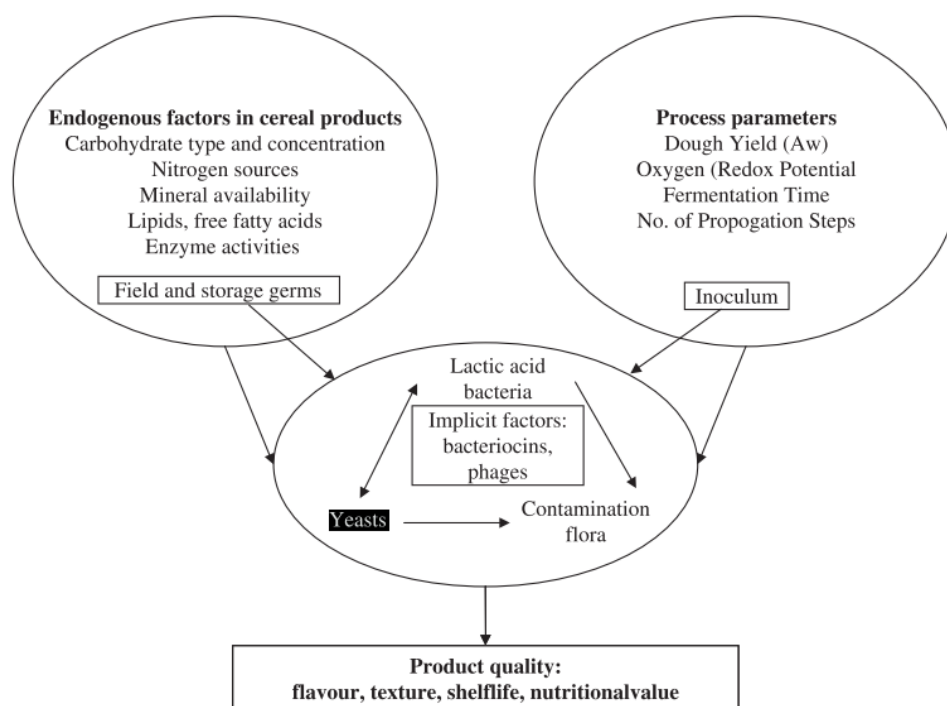
### **5.5. Diversité des pratiques**

L'enquête menée auprès des boulangers et paysans-boulangers met en avant la diversité des pratiques de panification pour produire du pain au levain naturel en France à partir de farine issue de l'Agriculture Biologique. En effet, tous les processus décrits diffèrent pour au moins deux facteurs étudiés. Ce travail a mis en évidence la difficulté d'obtenir des informations et de pouvoir les analyser. En effet, il s'agit d'un véritable travail d'anthropologie ou de sociologie de pouvoir mener et analyser les résultats d'une enquête semi-dirigée. Actuellement, une équipe de psychosociologues étudie la diversité des pratiques boulangères et la perception des consommateurs chez 30 boulangers choisis pour la diversité de leurs pratiques boulangères et répartis sur le territoire français, produisant du pain au levain naturel à partir de farine issue d'agriculture à faibles intrants (projet ANR Bakery). La communauté des microorganismes des levains et la qualité du pain associées aux pratiques sont également décrites, afin de poursuivre le travail de description et de conservation qui a démarré avec ce projet de thèse.

Il faut maintenant déterminer si l'ensemble de ces caractéristiques sont propres aux levains naturels français, aux levains produits à partir de farine issue de l'Agriculture Biologique ou à l'interaction de ces deux facteurs.

## **6. Description de l'ensemble de la communauté microbienne du levain et étude des qualités organoleptiques du pain associé**

Il semble indispensable d'aller plus loin dans l'analyse de la diversité des levains naturels. Il est essentiel, pour comprendre le fonctionnement complexe de l'écosystème levain et les facteurs abiotiques mis en jeu (Figure 2), de décrire les interactions microbiennes qui ont lieu entre les microorganismes, aussi bien entre souches d'une même espèce qu'entre souches d'espèces différentes ou entre les bactéries lactiques et les levures. La principale interaction reprise par la littérature scientifique concerne une association de souches de bactéries lactiques et de levures maltose-négatives/maltose-positives (voir pour revue De Vuyst *et al.*, 2009 ; Gobbetti 1998) mais il semble qu'il n'y ait pas de preuve que l'association *L. sanfranciscensis* – *K. exigua* ou *C. humilis* dans les levains soit due à l'absence de compétition pour le maltose. Les relations entre les souches microbiennes du levain sont probablement une combinaison de facteurs mettant en jeu à la fois la compétition pour les ressources (pour l'azote du milieu par exemple ou pour la fermentation des sucres de la farine, Gobbetti *et al.*, 1994a) mais également des effets de commensalisme et de mutualisme via la production de composés métaboliques directement ou indirectement bénéfiques pour la souche associée. La communauté microbienne, de par sa composition en espèces, joue un rôle clef sur les qualités organoleptiques du pain, via la production de composés métaboliques notamment, qui peuvent être modifiés par les pratiques de panification (exemple : le pétrissage a un effet indirect sur les qualités organoleptiques du pain via l'effet du potentiel redox sur le métabolisme des LAB, Stolz *et al.*, 1993). De plus, comme en œnologie où chaque souche permet d'obtenir des composés aromatiques différents (Romano *et al.*, 2003), une communauté microbienne propre à chaque levain pourrait être à la source de la signature des caractéristiques organoleptiques du pain produit dans chaque fournil. Une exploration des gènes d'intérêt par une méthode NGS permettrait de mieux décrire les fonctions de l'écosystème levain.



**Figure 2 :** Facteurs affectant la croissance et le métabolisme des microorganismes du levain ainsi que la qualité du pain au levain (extrait de Hammes et Gänzle 1997).

## 7. La diversité des levures en panification : intérêts, avantages et perspectives associées

Le but de cette thèse était principalement de décrire et conserver la diversité des levures des levains naturels étudiés. Au total, 2 102 souches ont été isolées et sont aujourd'hui conservées à l'UMR de Génétique Végétale du Moulon. Cette collection de souches est un état des lieux partiel de la diversité présente dans des levains naturels à un moment donné. Dans les années à venir, elles pourront être phénotypées et caractérisées génétiquement afin de compléter leur description.

Pour les artisans, cette étude met en avant leur implication dans le maintien de la biodiversité, au niveau microbien et leur rôle dans la perpétuation d'un savoir-faire ancestral : la production de pain au levain. Le travail mené ici pose aussi des questions quant aux applications industrielles et aux dérivés qui pourraient apparaître après caractérisation des souches. En effet, il est crucial pour la communauté scientifique de mieux conserver et décrire la biodiversité mais il est primordial de protéger les artisans contre une appropriation des souches par des industriels, qui pourrait mener à des batailles judiciaires concernant le droit de propriété via des dépôts de brevets. Pour éviter cela, des accords ont été mis en place entre les boulangers et les scientifiques à travers la signature d'un Material Transfer Agreement (MTA) qui comporte trois niveaux :

- Le dépôt ouvert : Le boulanger accepte que la souche soit apportée aux partenaires du projet BAKERY pour sa réalisation et accepte qu'elle puisse être diffusée à des tiers à des fins de recherche, sous réserve qu'il soit informé préalablement à chaque diffusion ;
- Le dépôt fermé : Le boulanger souhaite que la souche soit conservée en dépôt fermé (avec accès pour le Centre International des Ressources Microbiennes) : la souche sera utilisée uniquement par les partenaires BAKERY pour la réalisation du projet. Aucun transfert à des tiers n'est pas autorisé. Le CIRM est autorisé à effectuer des recherches sur cette souche ;
- Le dépôt fermé sans accès pour le CIRM: Le boulanger accepte que la souche soit utilisée uniquement aux fins du projet BAKERY sans transmission possible aux tiers, sans possibilité pour le CIRM d'effectuer des recherches autres que de la classification et de la taxonomie.

Ainsi, chaque artisan peut décider de comment et à qui seront diffusées les souches de son levain.

Le pain fait partie du patrimoine français, malgré la diminution indéniable de la consommation par habitant en un siècle et une offre qui tend à la consommation d'un pain industriel levé à la levure et à la farine blanche (Labro 2013). Il y a aujourd'hui un regain d'intérêt pour le pain artisanal et la production de pain au levain. Au-delà du souhait des boulangers, et notamment des paysans-boulangers, de participer au maintien de la biodiversité, le constat est là : une diversité toute particulière, celle des levures, est conservée dans leur levain.

## BIBLIOGRAPHIE

- Albertin, W., P. Marullo, M. Aigle, A. Bourgeois, M. Bely, C. Dillmann, D. De Vienne, et D. Sicard. 2009. « Evidence for Autotetraploidy Associated with Reproductive Isolation in *Saccharomyces Cerevisiae*: Towards a New Domesticated Species ». *Journal of Evolutionary Biology* 22 (11): 2157-70. doi:10.1111/j.1420-9101.2009.01828.x.
- Amend, Anthony S., Keith A. Seifert, et Thomas D. Bruns. 2010. « Quantifying Microbial Communities with 454 Pyrosequencing: Does Read Abundance Count? ». *Molecular Ecology* 19 (24): 5555-65. doi:10.1111/j.1365-294X.2010.04898.x.
- Barnosky, Anthony D., Nicholas Matzke, Susumu Tomiya, Guinevere O. U. Wogan, Brian Swartz, Tiago B. Quental, Charles Marshall, *et al.*, 2011. « Has the Earth's Sixth Mass Extinction Already Arrived? ». *Nature* 471 (7336): 51-57. doi:10.1038/nature09678.
- Brandt, M. J., W. P. Hammes, et M. G. Ganzle. 2004. « Effects of Process Parameters on Growth and Metabolism of *Lactobacillus Sanfranciscensis* and *Candida Humilis* during Rye Sourdough Fermentation ». *European Food Research and Technology* 218 (4): 333-38. doi:10.1007/s00217-003-0867-0.
- Brock, Thomas D., et Michael T. Madigan. 1991. *Biology of Microorganisms*. 6th Edition. Upper Saddle River, NJ Hardcover: Prentice Hall. <http://www.abebooks.com/Biology-Microorganisms-6th-Edition-Brock-Thomas/780911915/bd>.
- CBD. 1992. Convention on Biological Diversity. Consulté le 13 Novembre 2014. Disponible en ligne: <https://www.cbd.int/doc/legal/cbd-fr.pdf>
- Comai, Luca. 2005. « The Advantages and Disadvantages of Being Polyploid ». *Nature Reviews Genetics* 6 (11): 836-46. doi:10.1038/nrg1711.
- Corsetti, A., J. Rossi, et Marco Gobbetti. 2001. « Interactions between yeasts and bacteria in the smear surface-ripened cheeses ». *International journal of food microbiology* 69 (1): 1-10.
- De Vuyst, L., S. Van Kerrebroeck, H. Harth, G. Huys, H.-M. Daniel, et S. Weckx. 2014. « Microbial Ecology of Sourdough Fermentations: Diverse or Uniform? ». *Food Microbiology* 37 (février): 11-29. doi:10.1016/j.fm.2013.06.002.
- De Vuyst, L., G. Vrancken, F. Ravyts, T. Rimaux, et S. Weckx. 2009. « Biodiversity, ecological determinants, and metabolic exploitation of sourdough microbiota ». *Food microbiology*.
- Dunn, Barbara, et Gavin Sherlock. 2008. « Reconstruction of the Genome Origins and Evolution of the Hybrid Lager Yeast *Saccharomyces Pastorianus* ». *Genome Research* 18 (10): 1610-23. doi:10.1101/gr.076075.108.
- Ganzle, M. G., M. Ehmann, et W. P. Hammes. 1998. « Modeling of Growth of *Lactobacillus Sanfranciscensis* and *Candida Milleri* in Response to Process Parameters of Sourdough Fermentation ». *Applied and Environmental Microbiology* 64 (7): 2616-23.
- Gänzle, Michael G. 2014. « Enzymatic and Bacterial Conversions during Sourdough Fermentation ». *Food Microbiology* 37 (février): 2-10. doi:10.1016/j.fm.2013.04.007.

- Gobbetti, M. 1998. « The Sourdough Microflora: Interactions of Lactic Acid Bacteria and Yeasts ». *Trends in Food Science & Technology* 9 (7): 267-74. doi:10.1016/S0924-2244(98)00053-3.
- Gobbetti, M., A. Corsetti, et J. Rossi. 1994a. « The sourdough microflora. Interactions between lactic acid bacteria and yeasts: metabolism of amino acids ». *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 10 (3): 275-79.
- Gobbetti, M., A.. 1994b. « The Sourdough Microflora - Interactions Between Lactic-Acid Bacteria and Yeasts - Metabolism of Carbohydrates ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 41 (4): 456-60.
- Goesaert, H., K. Brijs, W.S. Veraverbeke, C.M. Courtin, K. Gebruers, et J.A. Delcour. 2005. « Wheat Flour Constituents: How They Impact Bread Quality, and How to Impact Their Functionality ». *Trends in Food Science & Technology* 16 (1-3): 12-30. doi:10.1016/j.tifs.2004.02.011.
- Griffith, Gareth W. 2012. « Do we need a global strategy for microbial conservation? ». *Trends in ecology & evolution* 27 (1): 1-2.
- Hammes, W. P., et M. G. Gänzle. 1997. « Sourdough Breads and Related Products ». In *Microbiology of Fermented Foods*, édité par Brian J. B. Wood, 199-216. Springer US. [http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4613-0309-1\\_8](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4613-0309-1_8).
- Hernandez-Lopez, M. J., J. A. Prieto, et F. Randez-Gil. 2003. « Osmotolerance and Leavening Ability in Sweet and Frozen Sweet Dough. Comparative Analysis between *Torulaspora Delbrueckii* and *Saccharomyces Cerevisiae* Baker's Yeast Strains ». *Antonie van Leeuwenhoek* 84 (2): 125- 34. doi:10.1023/A:1025413520192.
- Huyghe, Lucie. 2014. Diversité génétique et phénotypique de *Saccharomyces cerevisiae* en boulangerie. Stage de Master 2 Ecologie, Biodiversité, Evolution. Université Paris-Sud 11.
- Kandror, Olga, Nancy Bretschneider, Evgeniy Kreydin, Duccio Cavalieri, et Alfred L Goldberg. 2004. « Yeast Adapt to Near-Freezing Temperatures by STRE/Msn2,4-Dependent Induction of Trehalose Synthesis and Certain Molecular Chaperones ». *Molecular Cell* 13 (6): 771-81. doi:10.1016/S1097-2765(04)00148-0.
- Khilberg, I, L Johansson, A Kohler, et E Risvik. 2004. « Sensory quality of whole wheat pan bread-influence of farmingsystem, milling and baking technique. » *Journal of Cereal Science* 39: 67-84.
- Kurtzman, C. P., et C. J. Robnett. 2003. « Phylogenetic Relationships among Yeasts of the "Saccharomyces Complex" Determined from Multigene Sequence Analyses ». *Fems Yeast Research* 3 (4): 417-32. doi:10.1016/S1567-1356(03)00012-6.
- Labro, Camille. 2013. « Le pain superstar ». *Le Monde.fr*. octobre 25. [http://www.lemonde.fr/le-magazine/article/2013/10/25/le-pain-super-star\\_3501984\\_1616923.html](http://www.lemonde.fr/le-magazine/article/2013/10/25/le-pain-super-star_3501984_1616923.html).
- Lhomme, E., C. Urien, J. Legrand, X. Dousset, B. Onnot & D. Sicard. Accepted. Sourdough microbial community dynamics: an analysis during French organic bread-making processes. *Food Microbiology*.
- Liggenstoffer, Audra S., Noha H. Youssef, M. B. Couger, et Mostafa S. Elshahed. 2010. « Phylogenetic Diversity and Community Structure of Anaerobic Gut Fungi (phylum Neocallimastigomycota)

- in Ruminant and Non-Ruminant Herbivores ». *The ISME Journal* 4 (10): 1225-35. doi:10.1038/ismej.2010.49.
- Luangsakul, Naphatrapi, Suwimon Keeratipibul, Sasitorn Jindamorakot, et Somboon Tanasupawat. 2009. « Lactic Acid Bacteria and Yeasts Isolated from the Starter Doughs for Chinese Steamed Buns in Thailand ». *LWT - Food Science and Technology* 42 (8): 1404-12. doi:10.1016/j.lwt.2009.03.007.
- Meroth, C. B., W. P. Hammes, et C. Hertel. 2003. « Identification and Population Dynamics of Yeasts in Sourdough Fermentation Processes by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis ». *Applied and Environmental Microbiology* 69 (12): 7453-61. doi:10.1128/AEM.69.12.7453-7461.2003.
- Meroth, C. B., J. Walter, C. Hertel, M. J. Brandt, et W. P. Hammes. 2003. « Monitoring the Bacterial Population Dynamics in Sourdough Fermentation Processes by Using PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis ». *Applied and Environmental Microbiology* 69 (1): 475-82. doi:10.1128/AEM.69.1.475-482.2003.
- Meroth, Christiane B, Walter P Hammes, et Christian Hertel. 2003. « Identification and population dynamics of yeasts in sourdough fermentation processes by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis ». *Applied and environmental microbiology* 69 (12): 7453-61.
- Oury, F.-X., F. Leenhardt, C. Révész, E. Chanliaud, B. Duperrier, F. Balfourier, et G. Charmet. 2006. « Genetic variability and stability of grain magnesium, zinc and iron concentrations in bread wheat ». *European Journal of Agronomy* 25 (2): 177-85. doi:10.1016/j.eja.2006.04.011.
- Pereira, Henrique M., Paul W. Leadley, Vânia Proença, Rob Alkemade, Jörn P. W. Scharlemann, Juan F. Fernandez-Manjarrés, Miguel B. Araújo, *et al.*, 2010. « Scenarios for Global Biodiversity in the 21st Century ». *Science* 330 (6010): 1496-1501. doi:10.1126/science.1196624.
- Pulvirenti, Andrea, Cinzia Caggia, Cristina Restuccia, Maria Gullo, et Paolo Giudici. 2001. « DNA fingerprinting methods used for identification of yeasts isolated from Sicilian sourdoughs ». *Annals of microbiology* 51 (1): 107-20.
- Romano, P., C. Fiore, M. Paraggio, M. Caruso, et A. Capece. 2003. « Function of Yeast Species and Strains in Wine Flavour ». *International Journal of Food Microbiology* 86 (1-2): 169-80.
- Rosenberg, Eugene, Omry Koren, Leah Reshef, Rotem Efrony, et Ilana Zilber-Rosenberg. 2007. « The Role of Microorganisms in Coral Health, Disease and Evolution ». *Nature Reviews Microbiology* 5 (5): 355-62. doi:10.1038/nrmicro1635.
- Roussel, Philippe, et Hubert Chiron. 2005. *Les pains français : évolution, qualité, production (2° Ed.)*. Lavoisier. <http://www.lavoisier.fr/livre/notice.asp?ouvrage=2261627>.
- Schade, Babette, Gregor Jansen, Malcolm Whiteway, Karl D. Entian, et David Y. Thomas. 2004. « Cold Adaptation in Budding Yeast ». *Molecular Biology of the Cell* 15 (12): 5492-5502. doi:10.1091/mbc.E04-03-0167.
- Stewart, Laura C., Nelson K. Richtmyer, et C. S. Hudson. 1949. « TREHALOSE FROM YEAST ». *Journal of the American Chemical Society* 71 (6): 2277-2277. doi:10.1021/ja01174a540.



- Stolz, Peter, Georg Böcker, Rudi F. Vogel, et Walter P. Hammes. 1993. « Utilisation of Maltose and Glucose by Lactobacilli Isolated from Sourdough ». *FEMS Microbiology Letters* 109 (2-3): 237-42. doi:10.1111/j.1574-6968.1993.tb06174.x.
- Succi, M, A Reale, C Andrighetto, A Lombardi, E Sorrentino, et R Coppola. 2003. « Presence of Yeasts in Southern Italian Sourdoughs from Triticum Aestivum Flour ». *FEMS Microbiology Letters* 225 (1): 143-48. doi:10.1016/S0378-1097(03)00500-7.
- Sugihara, T. F., Leo Kline, et M. W. Miller. 1971. « Microorganisms of the San Francisco sour dough bread process I. Yeasts responsible for the leavening action ». *Applied microbiology* 21 (3): 456-58.
- UICN (Union Internationale de Conservation de la Nature), 2014. The IUCN red list of threatened species 2014.3. Consulté le 16 Novembre 2014. Disponible en ligne: <http://www.iucnredlist.org/details/>
- Valmorri, Sara, Rosanna Tofalo, Luca Settanni, Aldo Corsetti, et Giovanna Suzzi. 2010. « Yeast Microbiota Associated with Spontaneous Sourdough Fermentations in the Production of Traditional Wheat Sourdough Breads of the Abruzzo Region (Italy) ». *Antonie van Leeuwenhoek* 97 (2): 119-29. doi:10.1007/s10482-009-9392-x.
- Vernocchi, Pamela, Sara Valmorri, Veronica Gatto, Sandra Torriani, Andrea Gianotti, Giovanna Suzzi, Maria Elisabetta Guerzoni, et Fausto Gardini. 2004. « A Survey on Yeast Microbiota Associated with an Italian Traditional Sweet-Leavened Baked Good Fermentation ». *Food Research International* 37 (5): 469-76. doi:10.1016/j.foodres.2004.01.004.
- Vigentini, Ileana, Davide Antoniani, Luca Roscini, Andrea Comasio, Silvia Galafassi, Claudia Picozzi, Laura Corte, et al., 2014. « Candida Milleri Species Reveals Intraspecific Genetic and Metabolic Polymorphisms ». *Food Microbiology* 42 (septembre): 72-81. doi:10.1016/j.fm.2014.02.011.
- Vogelmann, Stephanie A., et Christian Hertel. 2011. « Impact of ecological factors on the stability of microbial associations in sourdough fermentation ». *Food Microbiology* 28 (3): 583-89. doi:10.1016/j.fm.2010.11.010.
- Vrancken, Gino, Luc De Vuyst, Roel Van der Meulen, Geert Huys, Peter Vandamme, et Heide-Marie Daniel. 2010. « Yeast Species Composition Differs between Artisan Bakery and Spontaneous Laboratory Sourdoughs ». *Fems Yeast Research* 10 (4): 471-81. doi:10.1111/j.1567-1364.2010.00621.x.

# **ANNEXES**

## Annexe 1 : Questionnaire d'enquête menée auprès de boulangers et paysans-boulangers français

### Questions sur la panification:

- 1- Depuis quand faites-vous du pain ?
- 2- Comment et où avez-vous appris à faire le pain ?
- 3- Quel(s) type(s) de pain fabriquez-vous ? Si « pains spéciaux » : pourquoi ?
- 4- Quelle farine utilisez-vous pour la panification ?
  - utilisez-vous votre propre farine ?
  - quelle(s) variété(s) de blé utilisez-vous ?
  - quelle est la mouture de la farine (taille ? meule utilisée? réglage du moulin) ?
  - quelles sont les autres caractéristiques de votre farine ?
  - prenez-vous en note la température de la pièce où à lieu la panification ?
- 5- Pouvez-vous décrire les différentes étapes de la panification ?
  - quelle méthode de pétrissage utilisez-vous ?
  - quel type de four utilisez-vous (taille en kg ou capacité) ?
  - quels sont les ingrédients qui composent votre pain ? Ajoutez-vous de la levure ou un autre starter lors de votre panification ?
  - quelle type d'eau utilisez-vous (eau de source ou autre)?
- 6- Quelle est la fréquence de vos panifications ?
- 7- Combien de pains faites-vous par panification ?
- 8- Où vendez-vous votre pain ? À qui ?
- 9- Qui s'occupe de la panification ? de la vente ?
- 10- Pour vous, qu'est-ce que le « pain » ? Votre pain ?

### Questions sur le levain :

- 1- Comment avez-vous initié votre levain ?
- 2- Pouvez-vous décrire le cycle de vie de votre levain ? Sur combien de temps s'effectue-t-il ?
  - pouvez-vous préciser comment vous faites le rafraichis?
  - combien de temps cela vous prend?
  - quantité de levain (au moment du dernier rafraichis) ?
  - quantité de farine ?
  - quantité d'eau et sa provenance (eau de source par exemple)?
  - quantité de sel ? Provenance ?
  - ajoutez-vous autre chose à votre levain ?
  - pouvez-vous préciser le nombre de rafraichis effectués entre 2 panifications ?
  - quelle est la concentration de votre levain (pourcentage de levain par rapport à la masse totale de pâte)?
  - varie-t-elle en fonction des saisons ?
  - si oui : pourquoi ?
- 3- Depuis quand utilisez-vous le même levain ?
  - redémarrez-vous votre levain tous les ans ? Sinon, tous les combien ? Pourquoi ?
- 4- Quelle farine utilisez-vous pour votre levain ?
  - est-ce la même que celle utilisée pour la panification ?
  - utilisez-vous votre propre farine ?
  - quelle(s) variété(s) de blé utilisez-vous ?
  - quelle est la mouture de la farine (taille ? meule utilisée? réglage du moulin) ?
  - quelles sont les autres caractéristiques de votre farine ?
- 5- Comment stockez-vous votre levain ? À quelle température ?
- 6- Votre levain est-il pâteux ou liquide ?
- 7- Avez-vous déjà utilisé le levain d'une autre personne ? Avez-vous déjà diffusé votre levain à une autre personne ? si oui : dans quel cadre ?
- 8- Avez-vous déjà utilisé de la levure de boulangerie ? Si oui : était-elle fraîche ou sèche ? Pourquoi utilisez-vous ou avez-vous utilisé de la levure de boulangerie ?
- 9- Qui gère le levain entre les panifications ? les rafraichis ?
- 10- Pour vous, qu'est-ce que le « levain » ? Votre levain ?

### Questions générales

- 11- Quels boulangers connaissez-vous de nom? Lesquels avez-vous rencontré ? Avec lesquels avez-vous échangé sur les méthodes de panification ? Avec lesquels avez-vous échangé des semences ? Avec lesquels avez-vous échangé du levain ?
- 12- Avez-vous déjà fait de la microbrasserie ? Si oui, pouvez-vous rapidement décrire votre procédé de fabrication ?
- 13- Connaissiez-vous le RSP ? En faites-vous partie ? Si oui : depuis combien de temps ? Quelle est votre « action » au sein de ce réseau ?
- 14- Modifiez-vous votre pain en fonction des retours du consommateur ?
- 15- Avez-vous déjà été amenés à modifier vos pratiques de panification ou de rafraichi? Si oui, dans quelle mesure et pourquoi ?
- 16- Pour vous, quelle est la question la plus importante parmi celles soulevées dans cette enquête ?
- 17- D'après-vous, y-a-t-il des questions d'importances qui ne sont pas soulevées au cours de cette enquête ?
- 18- Certaines questions étaient-elles mal-posées ? Si oui, quelle suggestion proposez-vous pour les améliorer ?

Merci d'avoir répondu à notre questionnaire !

**Annexe 2 :** Dénombrement des colonies de levures en UFC (unité formant colonie) par mL de levain en fonction du milieu gélosé. YE = milieu gélosé Yeast-extract ; GEM = milieu gélosé à l'extrait de malt. Réplicat = code de répliat de dénombrement : LC = « levain chef » ; TP = « levain tout point » ; AP = « pâte après pétri » ; AC = « pâte avant cuisson ».  $10^{-2}$  = dilution du levain à  $10^{-2}$  ;  $10^{-4}$  = dilution du levain à  $10^{-4}$ . a, b, c = 3 réplcats de dénombrement.

réplicat\ milieu	YE	GEM
LC_10 <sup>-2</sup> a	0	1,59E+07
LC_10 <sup>-2</sup> b	1,41E+07	1,59E+07
LC_10 <sup>-2</sup> c	1,94E+07	2,07E+07
LC_10 <sup>-4</sup> a	1,30E+07	1,89E+07
LC_10 <sup>-4</sup> b	1,83E+07	1,34E+07
LC_10 <sup>-4</sup> c	1,44E+07	1,99E+07
TP_10 <sup>-2</sup> a	1,44E+07	1,24E+07
TP_10 <sup>-2</sup> b	1,54E+07	1,50E+07
TP_10 <sup>-2</sup> c	1,72E+07	1,35E+07
TP_10 <sup>-4</sup> a	1,20E+07	1,20E+07
TP_10 <sup>-4</sup> b	1,57E+07	1,61E+07
TP_10 <sup>-4</sup> c	1,69E+07	1,38E+07
AP_10 <sup>-2</sup> a	1,13E+07	1,02E+07
AP_10 <sup>-2</sup> b	6,13E+06	8,33E+06
AP_10 <sup>-2</sup> c	6,11E+06	8,15E+06
AP_10 <sup>-4</sup> a	4,07E+06	5,08E+06
AP_10 <sup>-4</sup> b	4,07E+05	3,86E+06
AP_10 <sup>-4</sup> c	0	0
AC_10 <sup>-2</sup> a	0	1,39E+07
AC_10 <sup>-2</sup> b	1,59E+07	1,80E+07
AC_10 <sup>-2</sup> c	1,26E+07	1,72E+07
AC_10 <sup>-4</sup> a	1,04E+07	7,93E+06
AC_10 <sup>-4</sup> b	9,55E+06	1,16E+07
AC_10 <sup>-4</sup> c	9,35E+06	5,89E+06



Extraction d'ADN en plaques 96 Whatman

Référence : ExtrADN96what\_v1  
Version : 1  
date de création : 03/05/2010  
Page 229/4  
Auteur : Xavier Raffoux,  
Delphine Sicard

**Objectifs :**

Extraire de l'ADN de haute qualité pour la PCR, à partir de cellule de levure fraîche ou garder à 20°C. Avec une plaque Whatman, on obtient de quoi faire 96 réactions PCR.

**Principe Général de la manipulation :**

- Destruction des parois et membranes par la zymoliasse
- Extraction des composés hydrosolubles en présence de métabisulfite, puis précipitation d'une partie des protéines par l'acétate de potassium et centrifugation pour éliminer les débris insolubles.
- Fixation des acides nucléiques sur une membrane de silice en présence d'ions chaotropes (chlorure de guanidium), lavage de la membrane, puis élution de l'ADN.

**Domaine d'application :**

- Toutes applications reposant sur la PCR, pour lesquelles la qualité de l'ADN est importante, mais il n'est pas nécessaire d'obtenir de grosses quantités (à exclure pour des blots).
- En particulier : amplification PCR de gènes pour séquençage ou génotypage SNP.

**Matériel :**

- Pipette multicanaux P300 avec cônes adaptés. (Ne pas utiliser les cônes habituels de P200)
- Centrifugeuse Héraus à 4°C
- Bain marie à 65°C
- 2 plaques deep well 2mL
- 2 plaques PCR 96
- 2 plaques de filtration (membrane laine de verre) Whatman unifilter 800 GF/B (Whatman Ref 7700-2803)

**Réactifs :**

1) Milieu Yeast extract 1%, Glucose 1%

Yeast Extract 14g

Glucose 14g

H2O 1.4L

2) Tampon de zymoliasse et zymoliasse

Préparation des solutions de sorbitol 1M, 0.1M Na2EDTA pH : 7.5 et de zymoliasse 20T :

Sorbitol 1M, 0.1M Na2EDTA pH : 7.5

→ Masse molaire sorbitol : 182.18 g/mol et masse molaire Na2EDTA : 372.2 g/mol

$m_{\text{sorbitol}} = C_{\text{sorbitol}} \text{ sol} * V_{\text{solution à préparer}} * M_{\text{sorbitol}}$

$m_{\text{Na2EDTA}} = C_{\text{Na2EDTA}} * V_{\text{solution à préparer}} * M_{\text{Na2EDTA}}$

→ Le pH est à ajuster à 7.5 à l'aide d'une solution de NaOH 10M (la solution sans ajustement est acide)

Zymoliase 20T

→ Préparer 25 mg/mL avec solution de sorbitol 1M, 0.1M Na<sub>2</sub>EDTA (peser avec balance de précision dans un tube eppendorf).

mzymoliase = Czymoliase sol \* Vzymoliase pour 1ech \* nbre ech

Exemple : pour 12 échantillons : mzymoliase = 25 \* 0.02 \* 12 = 6 mg de zymoliase

Rqe : Le sorbitol et la zymoliase 20T sont à conserver à +4°C.

3) Tampon d'extraction :

Volume final	100 ml	200 ml	300 ml	400ml
Tris 1M pH = 8	10ml	20	30	40
EDTA 0,5M	10ml	20	30	40
NaCl 2.5M	20ml	40	60	80
SDS 20%		6,25ml	12,5	19
PVP 40000	1 g	2 g	3 g	4 g
Na Bisulfite	1 g	2 g	3 g	4 g
ddH <sub>2</sub> O	53.5ml	107ml	161ml	215

Ajouter le NaBisulfite et la RNase A (Amersham) au moment de l'utilisation.

4) Acétate de potassium: (3M K et 5M Ac)

Pour 100 ml : mélanger 60 ml de KAc 5M, 11.5 ml d'acide acétique glacial et 28.5 ml d'H<sub>2</sub>O.

5) Tampon CGE (Chlorure de Guanidium 7.8M / Ethanol)

- Solution de Chlorure de guanidium 7.8 M . (Sigma Ref G-3272)

Dissoudre 37.25 gr de chlorure de guanidium dans l'eau jusqu'à un volume final de 50 ml de solution (faire le mélange dans un tube Sarstedt de 50 ml).

- Le tampon CGE est obtenu en mélangeant 1/3 de solution de chlorure de guanidium 7.8 M et 2/3 d'éthanol à 96%.

6) Tampon de lavage (éthanol et sels d'acétate de potassium)

- Faire une solution aqueuse (Acétate de potassium 160 mM, Tris HCl pH 8 22,5 mM, EDTA 0,1 mM)

Volume final	100 ml	200 ml	300 ml	400ml
Tris 1M pH = 8	2,25 ml	4,5 ml	6,75 ml	9 ml
EDTA 0,5M	20 µl	40 µl	60 µl	80 µl
Acétate de potassium 5 m	3,2 ml	6,4 ml	9,6 ml	12,8 ml
ddH <sub>2</sub> O	94,50 ml	189 ml	283,50 ml	378 ml

- Le tampon de lavage est obtenu en mélangeant 100 ml de cette solution et 170 ml d'éthanol à 96%.

### Hygiène et sécurité :

- Le tampon CGE contient du chlorure de guanidium qui est irritant. Porter des gants et éviter tout contact avec la peau.

## Déroulement de la manipulation :

DUREE : 3 Heures sans compter l'étape zymoliasse et la préparation des solutions.

### 1) Culture des cellules et digestion des parois par la zymoliasse

Faire une culture overnight de levures à 30°C dans du milieu YE 1% glucose 2%, soit dans des tubes 5 mL soit directement en deepwell 96 puits.

Centrifuger à 4000 rpm pendant 5 min si tubes 5 mL ou 5600 rpm pendant 15 minutes si deepwell.

Eliminer le surnageant par renversement.

Préparer le mélange tampon de zymoliasse et zymoliasse. Par échantillon préparer 0.5 mL de sorbitol, 0.1M Na<sub>2</sub>EDTA pH : 7.5 + 20 µL de Zymoliasse 20T à 25 mg/mL (cf chapitre « préparation des solutions » pour calculer la masse de zymoliasse)

Resuspendre le culot de cellules dans 0.5 mL du mélange (sorbitol, 0.1M Na<sub>2</sub>EDTA pH : 7.5 + zymoliasse).

Incuber pendant 1 heure à 37°C (étuve).

- Centrifuger à 5600 rpm pendant 15 minutes. Eliminer le surnageant par renversement.

### 2) Phase d'extraction :

Préchauffer le tampon d'extraction à 65°C.

Ajouter le Na Bisulfite : 1g pour 100mL

- Repartir 1000µL de tampon d'extraction dans chaque puit.

- Monter la plaque deep well entre plaques de la façon suivante, du bas vers le haut:

2 plaques métalliques en dessous + plaque deepwell + plastique souple + plaquette jaune de cone 200 µl + 2 plaques métalliques au dessus. Le tout serré avec 4 serres joins.

Agiter fermement par inversion (au dessus de l'évier).

Incuber à 65°C pendant 30 min au bain marie. Agiter par inversion toutes les 10 minutes.

### 2) Déprotéinisation et filtration

Défaire le montage. Ajouter 300 µl (avec multidispenseur eppendorf seringue 5mL) d'acétate de K (5M/3M) froid (dans la glace). Resceller la plaque deepwell entre plaques métalliques. Agiter doucement par inversion en utilisant un support de boîte de cône pour maintenir le film easy peel. Incuber 5 min dans la glace.

Centrifuger 10 min à 5600 rpm (à 4°C), rotor 6444.

Transférer 800 µl (4X200µL avec multi eppendorf) de surnageant dans une plaque DeepWell 96 propre.

### 3) Fixation de l'ADN

Ajouter 1000 µl de tampon CGE (avec multidispenseur et seringue 50 mL).

Mélanger soigneusement par pipetage (multipipette 200 µL).

Appliquer 800 µl du mélange sur chaque plaque Whatman unifilter (avec multi eppendorf).

Centrifuger les plaques 2 min à 5600 rpm à T° ambiante.

### 4) Lavage

1° lavage: déposer 500 µl de tampon de lavage (Ethanol et sel d'acétate de potassium) sur chaque colonne. Centrifuger les plaques 2 min à 5600 rpm à T° ambiante. Eliminer le liquide qui passe.

2° lavage: déposer 500 µl de tampon de lavage (Ethanol et sels d'acétate de potassium) sur la colonne.

Centrifuger les plaques 15 min à 5600 rpm à T° ambiante (pour bien essorer la colonne). Eliminer le liquide qui passe.

#### 5) Elution de l'ADN

Positionner les plaques PCR 96 sur un support de boîte de cône bleue. Poser les colonnes sur cet assemblage.

Déposer sur chaque colonne 50 µl d'eau UP préchauffée à 65 °C. Attendre 5 min à T° ambiante.

Centrifuger 2 min à 1000 rpm à T° ambiante. Récupérer le liquide qui passe sur les plaques PCR 96 en polypropylène

Déposer de nouveau sur la colonne 50 µl d'eau UP préchauffé à 65 °C. Attendre 5 min à T° ambiante.



**Annexe S** : Résumé de la collection des souches isolées au cours de la thèse : identification et caractérisation phénotypique.  
ID\_boul = Identifiant du fournil ; date\_prel = date du prélèvement ; date\_isolt = date d'isolement de la souche ; point = point de prélèvement du levain ; ID\_souche = identifiant de la souche ; espece = Nom de l'espèce identifiées ; *AluI* = profil de digestion par l'enzyme *AluI* ; *D1/D2* = séquençage de la souche en Sanger, région *D1/D2* ; *ACT1* = séquençage de la souche en Sanger, région *ACT1* ; SD = test d'auxotrophie sur milieu minimum ; gly = test de croissance sur milieu glycérol ; SPO et MC = test de sporulation sur milieux acétates ; API = tests d'assimilation de sucres ; FACS = analyse du contenu en ADN ; cell\_size = mesure de la taille de la souche

ID_boul	date_prel	date_isolt	point	ID_souche	rep_pate	espece	Alui	DID2	ACT1	SD	Gly	SPO	MC	API	FACS	cell_size
1	08/02/2012	09/02/2012	LC		1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a	oui	oui	oui	oui	oui		oui	oui	oui
1	08/02/2012	09/02/2012	LC		2	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	08/02/2012	09/02/2012	LC		3	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	08/02/2012	09/02/2012	LC		4	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	08/02/2012	09/02/2012	LC		5	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	08/02/2012	09/02/2012	LC		6	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	08/02/2012	09/02/2012	LC		7	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	08/02/2012	09/02/2012	LC		8	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	08/02/2012	09/02/2012	LC		9	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	08/02/2012	09/02/2012	LC		10	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	08/02/2012	09/02/2012	LC		11	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	08/02/2012	09/02/2012	LC		12	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	08/02/2012	09/02/2012	LC		13	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	08/02/2012	09/02/2012	LC		14	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	08/02/2012	09/02/2012	LC		15	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	08/02/2012	09/02/2012	LC		16	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	08/02/2012	09/02/2012	LC		17	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	08/02/2012	09/02/2012	LC		18	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	08/02/2012	09/02/2012	LC		19	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	08/02/2012	09/02/2012	LC		20	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	08/02/2012	09/02/2012	LC		21	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	08/02/2012	09/02/2012	LC		22	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	08/02/2012	09/02/2012	LC		23	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	08/02/2012	09/02/2012	LC		24	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	08/02/2012	09/02/2012	LC		25	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	08/02/2012	09/02/2012	LC		26	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	08/02/2012	09/02/2012	LC		27	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	08/02/2012	09/02/2012	LC		28	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	08/02/2012	09/02/2012	LC		29	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	08/02/2012	09/02/2012	LC		30	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	08/02/2012	09/02/2012	LC		31	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	08/02/2012	09/02/2012	LC		32	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	08/02/2012	09/02/2012	LC		33	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	08/02/2012	09/02/2012	LC		34	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	08/02/2012	09/02/2012	LC		35	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	08/02/2012	09/02/2012	LC		36	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	08/02/2012	09/02/2012	LC		37	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	08/02/2012	09/02/2012	LC		38	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	08/02/2012	09/02/2012	LC		39	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	08/02/2012	09/02/2012	LC		40	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	TP		1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	TP		2	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	TP		3	<i>Candida carpophila</i>	b									
1	09/02/2012	09/02/2012	TP		4	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	TP		5	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	TP		6	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	TP		7	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	TP		8	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	TP		9	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									

ID_boul	date_prel	date_isolt	point	ID_souche	rep_pate	espece	Alui	D1D2	ACT1	SD	Gly	SPO	MC	API	FACS	cell_size
1	09/02/2012	09/02/2012	TP		10	1 <i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	TP		11	1 <i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	TP		12	1 <i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	TP		14	1 <i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	TP		15	1 <i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	TP		16	1 <i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	TP		17	1 <i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	TP		18	1 <i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	TP		19	1 <i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	TP		20	1 <i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	TP		21	1 <i>Candida carpophila</i>	b	oui	oui							
1	09/02/2012	09/02/2012	TP		22	1 <i>Candida carpophila</i>	b									
1	09/02/2012	09/02/2012	TP		23	1 <i>Candida carpophila</i>	b									
1	09/02/2012	09/02/2012	TP		24	1 <i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	TP		25	1 <i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	TP		26	1 <i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	TP		27	1 <i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	TP		28	1 <i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	TP		29	1 <i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	TP		30	1 <i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	TP		31	1 <i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	TP		32	1 <i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	TP		33	1 <i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	TP		34	1 <i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	TP		35	1 <i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	TP		36	1 <i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	TP		37	1 <i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	TP		38	1 <i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	TP		39	1 <i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	TP		40	1 <i>Hyphopichia pseudoburtonii</i>	c	oui	oui							
1	09/02/2012	09/02/2012	AP		1	1 <i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AP		2	1 <i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AP		3	1 <i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AP		4	1 <i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AP		5	1 <i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AP		6	1 <i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AP		7	1 <i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AP		8	1 <i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AP		9	1 <i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AP		10	1 <i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AP		11	1 <i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AP		12	1 <i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AP		13	1 <i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AP		14	1 <i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AP		15	1 <i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AP		16	1 <i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AP		17	1 <i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AP		18	1 <i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AP		19	1 <i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									

ID_boul	date_prel	date_isolt	point	ID_souche	rep_pate	espece	Alui	D1D2	ACT1	SD	Gly	SPO	MC	API	FACS	cell_size
1	09/02/2012	09/02/2012	AP	20	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AP	21	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AP	22	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AP	23	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AP	24	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AP	25	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AP	26	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AP	27	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AP	28	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AP	29	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AP	30	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AP	31	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AP	32	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AP	33	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AP	34	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AP	35	1	NA	NA									
1	09/02/2012	09/02/2012	AP	36	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AP	37	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AP	38	1	<i>Hyphopichia pseudoburtonii</i>	d	oui	oui							
1	09/02/2012	09/02/2012	AP	39	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AP	40	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AC	1	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AC	2	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AC	3	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AC	4	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AC	5	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AC	6	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AC	7	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AC	8	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AC	9	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AC	10	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AC	11	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AC	12	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AC	13	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AC	14	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AC	15	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AC	16	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AC	17	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AC	18	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AC	19	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AC	20	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AC	21	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AC	22	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AC	23	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AC	24	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AC	25	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AC	26	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a	oui	oui	oui	oui	oui		oui	oui	oui
1	09/02/2012	09/02/2012	AC	28	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AC	29	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									

ID_boul	date_prel	date_isolt	point	ID_souche	rep_pate	espece	Alui	D1D2	ACT1	SD	Gly	SPO	MC	API	FACS	cell_size
1	09/02/2012	09/02/2012	AC	30	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AC	31	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AC	32	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AC	33	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AC	34	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AC	35	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AC	36	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AC	37	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AC	38	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AC	39	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	a									
1	09/02/2012	09/02/2012	AC	40	1	NA	NA									
2	01/03/2012	02/03/2012	LC	1	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e	oui	non							
2	01/03/2012	02/03/2012	LC	2	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	01/03/2012	02/03/2012	LC	3	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	01/03/2012	02/03/2012	LC	4	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	01/03/2012	02/03/2012	LC	5	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	01/03/2012	02/03/2012	LC	6	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	01/03/2012	02/03/2012	LC	7	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	01/03/2012	02/03/2012	LC	8	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	01/03/2012	02/03/2012	LC	9	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	01/03/2012	02/03/2012	LC	10	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	01/03/2012	02/03/2012	LC	11	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	01/03/2012	02/03/2012	LC	12	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	01/03/2012	02/03/2012	LC	13	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	01/03/2012	02/03/2012	LC	14	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	01/03/2012	02/03/2012	LC	15	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	01/03/2012	02/03/2012	LC	16	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	01/03/2012	02/03/2012	LC	17	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	01/03/2012	02/03/2012	LC	18	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	01/03/2012	02/03/2012	LC	19	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	01/03/2012	02/03/2012	LC	20	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	01/03/2012	02/03/2012	LC	21	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	01/03/2012	02/03/2012	LC	22	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	01/03/2012	02/03/2012	LC	23	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	01/03/2012	02/03/2012	LC	24	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	01/03/2012	02/03/2012	LC	25	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	01/03/2012	02/03/2012	LC	26	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	01/03/2012	02/03/2012	LC	27	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	01/03/2012	02/03/2012	LC	28	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	01/03/2012	02/03/2012	LC	29	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	01/03/2012	02/03/2012	LC	30	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	01/03/2012	02/03/2012	LC	31	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	01/03/2012	02/03/2012	LC	32	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	01/03/2012	02/03/2012	LC	33	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	01/03/2012	02/03/2012	LC	34	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	01/03/2012	02/03/2012	LC	35	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	01/03/2012	02/03/2012	LC	36	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	01/03/2012	02/03/2012	LC	37	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	01/03/2012	02/03/2012	LC	38	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									

ID_boul	date_prel	date_isolt	point	ID_souche	rep_pate	espece	Alui	D1D2	ACT1	SD	Gly	SPO	MC	API	FACS	cell_size
2	01/03/2012	02/03/2012	LC	39	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	01/03/2012	02/03/2012	LC	40	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	TP		1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	TP		2	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	TP		3	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	TP		4	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	TP		5	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	TP		6	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	TP		7	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	TP		8	<i>Kazachstania unispora</i>	e	oui	non					oui	oui	
2	02/03/2012	02/03/2012	TP		9	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	TP		10	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	TP		11	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	TP		12	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	TP		13	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	TP		14	NA	NA									
2	02/03/2012	02/03/2012	TP		15	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	TP		16	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	TP		17	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	TP		18	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	TP		19	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	TP		20	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	TP		21	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	TP		22	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	TP		23	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	TP		24	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	TP		25	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	TP		26	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	TP		27	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	TP		28	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	TP		29	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	TP		30	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	TP		31	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	TP		32	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	TP		33	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	TP		34	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	TP		35	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	TP		36	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	TP		37	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	TP		38	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	TP		39	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	TP		40	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	AP		1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	AP		2	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	AP		3	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	AP		4	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	AP		5	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	AP		6	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	AP		7	<i>Kazachstania unispora</i>	e									

ID_boul	date_prel	date_isolt	point	ID_souche	rep_pate	espece	Alui	D1D2	ACT1	SD	Gly	SPO	MC	API	FACS	cell_size
2	02/03/2012	02/03/2012	AP	8	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	AP	9	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	AP	10	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	AP	11	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	AP	12	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	AP	13	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	AP	14	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e	oui	non							
2	02/03/2012	02/03/2012	AP	15	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	AP	16	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	AP	17	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	AP	18	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	AP	19	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	AP	20	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	AP	21	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	AP	22	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	AP	23	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	AP	24	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	AP	25	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	AP	26	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	AP	27	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	AP	28	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	AP	29	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	AP	30	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	AP	31	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	AP	32	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	AP	33	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	AP	34	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	AP	35	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	AP	36	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	AP	37	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	AP	38	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	AP	39	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	AP	40	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	AC	1	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	AC	2	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	AC	3	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	AC	4	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	AC	5	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	AC	6	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	AC	7	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	AC	8	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	AC	9	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	AC	10	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e	oui	non			oui		oui	oui	
2	02/03/2012	02/03/2012	AC	11	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e	oui	non							
2	02/03/2012	02/03/2012	AC	12	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	02/03/2012	02/03/2012	AC	13	1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	i									
2	02/03/2012	02/03/2012	AC	14	1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	i									
2	02/03/2012	02/03/2012	AC	15	1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	i									
2	02/03/2012	02/03/2012	AC	16	1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	i									

ID_boul	date_prel	date_isolt	point	ID_souche	rep_pate	espece	Alui	D1D2	ACT1	SD	Gly	SPO	MC	API	FACS	cell_size
2	02/03/2012	02/03/2012	AC	17	1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	i									
2	02/03/2012	02/03/2012	AC	18	1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	i									
2	02/03/2012	02/03/2012	AC	19	1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	i									
2	02/03/2012	02/03/2012	AC	20	1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	i									
2	02/03/2012	02/03/2012	AC	21	1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	i									
2	02/03/2012	02/03/2012	AC	22	1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	i	oui	oui							
2	02/03/2012	02/03/2012	AC	23	1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	i	oui	oui							
2	02/03/2012	02/03/2012	AC	24	1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	i									
2	02/03/2012	02/03/2012	AC	25	1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	i									
2	02/03/2012	02/03/2012	AC	26	1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	i									
2	02/03/2012	02/03/2012	AC	27	1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	i									
2	02/03/2012	02/03/2012	AC	28	1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	i									
2	02/03/2012	02/03/2012	AC	29	1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	i									
2	02/03/2012	02/03/2012	AC	30	1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	i									
2	02/03/2012	02/03/2012	AC	31	1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	i									
2	02/03/2012	02/03/2012	AC	32	1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	i									
2	02/03/2012	02/03/2012	AC	33	1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	i									
2	02/03/2012	02/03/2012	AC	34	1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	i									
2	02/03/2012	02/03/2012	AC	35	1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	i									
2	02/03/2012	02/03/2012	AC	36	1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	i									
2	02/03/2012	02/03/2012	AC	37	1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	i									
2	02/03/2012	02/03/2012	AC	38	1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	i									
2	02/03/2012	02/03/2012	AC	39	1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	i									
2	02/03/2012	02/03/2012	AC	40	1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	i									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	1	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f	oui	oui							
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	2	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	3	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	4	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	5	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	6	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	7	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	8	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	9	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	10	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	11	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	12	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	13	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f	oui	oui							
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	14	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	15	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	16	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	17	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	18	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	19	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	20	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	21	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	22	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	23	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	24	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	25	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									



ID_boul	date_prel	date_isolt	point	ID_souche	rep_pate	espece	Alui	D1D2	ACT1	SD	Gly	SPO	MC	API	FACS	cell_size
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	26	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	27	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	28	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	29	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	30	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	31	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	32	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	33	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	34	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	35	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	36	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	37	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	38	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	39	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	40	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	1	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	2	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	3	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	4	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	5	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	6	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	7	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	8	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	9	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	10	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	11	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	12	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	13	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	14	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	15	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	16	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	17	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	18	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	19	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	20	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	21	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	22	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	23	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	24	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	25	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	26	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	27	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	28	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	29	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	30	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	31	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	32	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	33	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	34	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									

ID_boul	date_prel	date_isolt	point	ID_souche	rep_pate	espece	Alui	D1D2	ACT1	SD	Gly	SPO	MC	API	FACS	cell_size
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	35	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	36	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	37	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	38	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	39	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	40	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP	1	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP	2	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP	3	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f	oui	oui							
3	27/03/2012	27/03/2012	AP	4	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP	5	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP	6	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP	7	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP	8	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP	9	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP	10	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP	11	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP	12	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP	13	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP	14	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP	15	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP	16	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP	17	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP	18	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP	19	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP	20	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP	21	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP	22	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP	23	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP	24	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP	25	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP	26	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP	27	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP	28	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP	29	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP	30	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP	31	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP	32	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP	33	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP	34	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP	35	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP	36	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP	37	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP	38	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP	39	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP	40	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC	1	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC	2	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC	3	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									

ID_boul	date_prel	date_isolt	point	ID_souche	rep_pate	espece	Alui	D1D2	ACT1	SD	Gly	SPO	MC	API	FACS	cell_size
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		4	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		5	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		6	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		7	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		8	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		9	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		10	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		11	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		12	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		13	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		14	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		15	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		16	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		17	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		18	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		19	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		20	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		21	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		22	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		23	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		24	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		25	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		26	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		27	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		28	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		29	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		30	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		31	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		32	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	f	oui	oui	oui	oui	oui	oui		oui	
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		33	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		34	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		35	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		36	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		37	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		38	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		39	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		40	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC		1	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC		2	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC		3	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC		4	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC		5	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC		6	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC		7	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC		8	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC		9	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC		10	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC		11	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC		12	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	f									

ID_boul	date_prel	date_isolt	point	ID_souche	rep_pate	espece	Alui	D1D2	ACT1	SD	Gly	SPO	MC	API	FACS	cell_size
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	13	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	14	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f	oui	oui							
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	15	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	16	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	17	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	18	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	19	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	20	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	21	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	22	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	23	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	24	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	25	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	26	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	27	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	28	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	29	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	26/03/2012	27/03/2012	LC	30	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	1	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	2	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	3	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	4	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	5	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	6	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	7	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	8	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	9	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	10	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	11	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	12	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	13	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	14	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	15	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	16	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	17	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	18	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	19	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	20	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f	oui	oui							
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	21	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	22	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	23	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	24	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	25	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	26	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	27	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	28	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	29	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	TP	30	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP	1	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									

ID_boul	date_prel	date_isolt	point	ID_souche	rep_pate	espece	Alui	D1D2	ACT1	SD	Gly	SPO	MC	API	FACS	cell_size
3	27/03/2012	27/03/2012	AP		2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP		3	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP		4	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP		5	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP		6	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP		7	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP		8	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP		9	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP		10	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP		11	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP		12	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP		13	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP		14	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP		15	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP		16	<i>Kazachstania bulderi</i>	f	oui	oui							
3	27/03/2012	27/03/2012	AP		17	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP		18	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP		19	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP		20	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP		21	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP		22	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP		23	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP		24	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP		25	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP		26	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP		27	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP		28	<i>Kazachstania bulderi</i>	f	oui	oui							
3	27/03/2012	27/03/2012	AP		29	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AP		30	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		3	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		4	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		5	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		6	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		7	<i>Kazachstania bulderi</i>	f	oui	oui							
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		8	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		9	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		10	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		11	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		12	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		13	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		14	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		15	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		16	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		17	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		18	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		19	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC		20	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									

ID_boul	date_prel	date_isolt	point	ID_souche	rep_pate	espece	Alui	D1D2	ACT1	SD	Gly	SPO	MC	API	FACS	cell_size
3	27/03/2012	27/03/2012	AC	21	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC	22	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC	23	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC	24	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC	25	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC	26	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC	27	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC	28	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	27/03/2012	27/03/2012	AC	29	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	1	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	2	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	3	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	4	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g	oui	oui							
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	5	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	6	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	7	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	8	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	9	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	10	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	11	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	12	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	13	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	14	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	15	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	16	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	17	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	18	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	19	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	20	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	21	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	22	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	23	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	24	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	25	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	26	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	27	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	28	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	29	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	30	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	31	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	32	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	33	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	34	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	35	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	36	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	37	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	38	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	39	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	40	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									

ID_boul	date_prel	date_isolt	point	ID_souche	rep_pate	espece	Alui	D1D2	ACT1	SD	Gly	SPO	MC	API	FACS	cell_size
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		1	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		2	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		3	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		4	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		5	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		6	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		7	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		8	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		9	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		10	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		11	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		12	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		13	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		14	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		15	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		16	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		17	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		18	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		19	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		20	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		21	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		22	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		23	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		24	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		25	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		26	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		27	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		28	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		29	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		30	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		31	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		32	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		33	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		34	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		35	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		36	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		37	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		38	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		39	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		40	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP		1	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP		2	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP		3	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP		4	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP		5	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP		6	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP		7	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP		8	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP		9	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									

ID_boul	date_prel	date_isolt	point	ID_souche	rep_pate	espece	Alui	D1D2	ACT1	SD	Gly	SPO	MC	API	FACS	cell_size
4	25/04/2012	25/04/2012	AP		10	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP		11	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP		12	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP		13	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP		14	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP		15	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP		16	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP		17	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP		18	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP		19	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP		20	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP		21	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP		22	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP		23	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP		24	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP		25	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP		26	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP		27	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP		28	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP		29	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP		30	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g	oui	oui							
4	25/04/2012	25/04/2012	AP		31	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP		32	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP		33	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP		34	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP		35	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP		36	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP		37	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP		38	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP		39	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP		40	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		1	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		2	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g	oui	oui							
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		3	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		4	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		5	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		6	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		7	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		8	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		9	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		10	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		11	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		12	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		13	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		14	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		15	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		16	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		17	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		18	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									



ID_boul	date_prel	date_isolt	point	ID_souche	rep_pate	espece	Alui	D1D2	ACT1	SD	Gly	SPO	MC	API	FACS	cell_size
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		19	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		20	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		21	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		22	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		23	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		24	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		25	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		26	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		27	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		28	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		29	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		30	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		31	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		32	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		33	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		34	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		35	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		36	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		37	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		38	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		39	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		40	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC		1	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC		2	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC		3	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC		4	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC		5	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC		6	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC		7	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC		8	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g	oui	oui							
4	24/04/2012	25/04/2012	LC		9	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC		10	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC		11	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC		12	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC		13	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC		14	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC		15	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC		16	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC		17	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC		18	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC		19	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC		20	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC		21	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC		22	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC		23	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC		24	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC		25	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC		26	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC		27	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									

ID_boul	date_prel	date_isolt	point	ID_souche	rep_pate	espece	Alui	D1D2	ACT1	SD	Gly	SPO	MC	API	FACS	cell_size
4	24/04/2012	25/04/2012	LC		28	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC		29	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC		30	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		1	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		2	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		3	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		4	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		5	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		6	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		7	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		8	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		9	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		10	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		11	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		12	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		13	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g	oui	oui							
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		14	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		15	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		16	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		17	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		18	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		19	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		20	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		21	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		22	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		23	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		24	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		25	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		26	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		27	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		28	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		29	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	TP		30	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP		1	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP		2	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP		3	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP		4	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP		5	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP		6	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP		7	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP		8	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP		9	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP		10	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP		11	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP		12	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP		13	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP		14	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP		15	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP		16	2 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									

ID_boul	date_prel	date_isolt	point	ID_souche	rep_pate	espece	Alui	D1D2	ACT1	SD	Gly	SPO	MC	API	FACS	cell_size
4	25/04/2012	25/04/2012	AP	17	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP	18	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	g	oui	oui							
4	25/04/2012	25/04/2012	AP	19	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP	20	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP	21	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP	22	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP	23	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP	24	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP	25	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP	26	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP	27	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP	28	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP	29	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AP	30	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC	1	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC	2	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC	3	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC	4	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC	5	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC	6	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC	7	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC	8	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC	9	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC	10	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC	11	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC	12	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	g	oui	oui							
4	25/04/2012	25/04/2012	AC	13	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC	14	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC	15	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC	16	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC	17	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC	18	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC	19	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC	20	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC	21	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC	22	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC	23	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC	24	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC	25	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC	26	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC	27	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC	28	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC	29	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC	30	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	1	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	2	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	3	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	4	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	5	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									

ID_boul	date_prel	date_isolt	point	ID_souche	rep_pate	espece	Alui	D1D2	ACT1	SD	Gly	SPO	MC	API	FACS	cell_size
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	6	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	7	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	8	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	9	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	10	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	11	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	13	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	14	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g	oui	oui							
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	15	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	16	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	17	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	18	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	19	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	20	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	21	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	22	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	23	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	25	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	26	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	27	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	28	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	29	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	30	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	31	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	32	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	33	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	34	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	35	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	37	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	38	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	39	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	24/04/2012	25/04/2012	LC	40	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC	1	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC	2	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC	3	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC	4	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC	5	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC	6	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC	8	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC	9	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g	oui	oui							
4	25/04/2012	25/04/2012	AC	10	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC	11	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC	12	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC	13	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC	14	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC	15	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC	16	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC	17	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC	18	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	g									

ID_boul	date_prel	date_isolt	point	ID_souche	rep_pate	espece	Alui	D1D2	ACT1	SD	Gly	SPO	MC	API	FACS	cell_size
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		20	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		21	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		22	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		23	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		24	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		25	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		26	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		27	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		28	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		29	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		31	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		32	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		33	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		34	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		35	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		36	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		37	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		38	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		39	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
4	25/04/2012	25/04/2012	AC		40	1 <i>Kazachstania bulderi</i>	g									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		1	1 <i>Candida humilis</i>	h	oui	oui							
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		2	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		3	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		4	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		5	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		6	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		7	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		8	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		9	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		10	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		11	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		12	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		13	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		14	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		15	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		16	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		17	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		18	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		19	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		20	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		21	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		22	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		23	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		24	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		25	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		26	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		27	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		28	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		29	1 <i>Candida humilis</i>	h									

ID_boul	date_prel	date_isolt	point	ID_souche	rep_pate	espece	Alui	D1D2	ACT1	SD	Gly	SPO	MC	API	FACS	cell_size
5	30/05/2012	31/05/2012	LC	30	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC	31	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC	32	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC	33	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC	34	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC	35	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC	36	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC	37	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC	38	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC	39	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC	40	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP	1	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP	2	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP	3	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP	4	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP	5	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP	6	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP	7	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP	8	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP	9	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP	10	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP	11	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP	12	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP	13	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP	14	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP	15	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP	16	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP	17	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP	18	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP	19	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP	20	1	<i>Candida humilis</i>	h	oui	oui			oui		oui		oui
5	31/05/2012	31/05/2012	TP	21	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP	22	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP	23	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP	24	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP	25	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP	26	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP	27	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP	28	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP	29	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP	30	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP	31	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP	32	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP	33	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP	34	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP	35	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP	36	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP	37	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP	38	1	<i>Candida humilis</i>	h									

ID_boul	date_prel	date_isolt	point	ID_souche	rep_pate	espece	Alui	D1D2	ACT1	SD	Gly	SPO	MC	API	FACS	cell_size
5	31/05/2012	31/05/2012	TP	39	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP	40	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP	1	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP	2	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP	3	1	<i>Candida humilis</i>	h	oui	oui							
5	31/05/2012	31/05/2012	AP	4	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP	5	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP	6	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP	7	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP	8	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP	9	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP	10	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP	11	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP	12	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP	13	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP	14	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP	15	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP	16	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP	17	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP	18	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP	19	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP	20	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP	21	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP	22	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP	23	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP	24	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP	25	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP	26	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP	27	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP	28	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP	29	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP	30	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP	31	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP	32	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP	33	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP	34	1	NA	NA									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP	35	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP	36	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP	37	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP	38	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP	39	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP	40	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC	1	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC	2	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC	3	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC	4	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC	5	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC	6	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC	7	1	<i>Candida humilis</i>	h									

ID_boul	date_prel	date_isolt	point	ID_souche	rep_pate	espece	Alui	D1D2	ACT1	SD	Gly	SPO	MC	API	FACS	cell_size
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		8	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		9	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		10	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		11	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		12	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		13	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		14	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		15	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		16	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		17	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		18	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		19	1 <i>Candida humilis</i>	h	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		20	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		21	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		22	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		23	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		24	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		25	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		26	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		27	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		28	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		29	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		30	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		31	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		32	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		33	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		34	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		35	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		36	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		37	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		38	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		39	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		40	1 <i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		1	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		2	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		3	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		4	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		5	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		6	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		7	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		8	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		9	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		10	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		11	2 NA	NA									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		12	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		13	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		14	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		15	2 <i>Candida humilis</i>	h	oui	oui							
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		16	2 <i>Candida humilis</i>	h									



ID_boul	date_prel	date_isolt	point	ID_souche	rep_pate	espece	Alui	D1D2	ACT1	SD	Gly	SPO	MC	API	FACS	cell_size
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		17	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		18	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		19	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		20	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		21	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		22	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		23	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		24	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		25	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		26	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		27	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		28	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		29	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	30/05/2012	31/05/2012	LC		30	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP		1	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP		2	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP		3	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP		4	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP		5	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP		6	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP		7	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP		8	2 <i>Candida humilis</i>	h	oui	oui							
5	31/05/2012	31/05/2012	TP		9	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP		10	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP		11	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP		12	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP		13	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP		14	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP		15	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP		16	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP		17	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP		18	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP		19	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP		20	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP		21	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP		22	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP		23	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP		24	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP		25	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP		26	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP		27	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP		28	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP		29	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	TP		30	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP		1	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP		2	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP		3	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP		4	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP		5	2 <i>Candida humilis</i>	h									

ID_boul	date_prel	date_isolt	point	ID_souche	rep_pate	espece	Alui	D1D2	ACT1	SD	Gly	SPO	MC	API	FACS	cell_size
5	31/05/2012	31/05/2012	AP		6	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP		7	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP		8	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP		9	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP		10	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP		11	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP		12	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP		13	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP		14	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP		15	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP		16	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP		17	2 <i>Candida humilis</i>	h	oui	oui							
5	31/05/2012	31/05/2012	AP		18	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP		19	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP		20	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP		21	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP		22	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP		23	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP		24	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP		25	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP		26	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP		27	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP		28	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP		29	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AP		30	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		1	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		2	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		3	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		4	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		5	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		6	2 <i>Candida humilis</i>	h	oui	oui							
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		7	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		8	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		9	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		10	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		11	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		12	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		13	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		14	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		15	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		16	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		17	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		18	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		19	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		20	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		21	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		22	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		23	2 <i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC		24	2 <i>Candida humilis</i>	h									

ID_boul	date_prel	date_isolt	point	ID_souche	rep_pate	espece	Alui	D1D2	ACT1	SD	Gly	SPO	MC	API	FACS	cell_size
5	31/05/2012	31/05/2012	AC	25	2	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC	26	2	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC	27	2	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC	28	2	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC	29	2	<i>Candida humilis</i>	h									
5	31/05/2012	31/05/2012	AC	30	2	<i>Candida humilis</i>	h									
1	nov-12	nov-12	TP	1	1	<i>Kazachstania exigua</i>	k	oui	oui				oui		oui	oui
1	nov-12	nov-12	TP	2	1	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	3	1	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	4	1	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	5	1	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	6	1	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	7	1	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	8	1	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	9	1	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	10	1	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	11	1	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	12	1	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	13	1	<i>Kazachstania exigua</i>	k	oui	oui							
1	nov-12	nov-12	TP	14	1	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	15	1	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	16	1	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	17	1	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	18	1	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	19	1	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	20	1	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	21	1	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	22	1	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	23	1	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	24	1	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	25	1	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	26	1	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	27	1	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	28	1	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	29	1	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	30	1	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	31	1	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	32	1	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	33	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	j	oui	oui	oui	oui	oui		oui	oui	oui
1	nov-12	nov-12	TP	34	1	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	35	1	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	36	1	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	37	1	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	38	1	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	39	1	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	40	1	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	1	2	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	2	2	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	3	2	<i>Kazachstania exigua</i>	k									

ID_boul	date_prel	date_isolt	point	ID_souche	rep_pate	espece	Alui	D1D2	ACT1	SD	Gly	SPO	MC	API	FACS	cell_size
1	nov-12	nov-12	TP	4	2	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	5	2	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	6	2	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	7	2	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	8	2	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	9	2	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	10	2	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	11	2	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	12	2	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	13	2	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	14	2	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	15	2	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	16	2	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	17	2	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	18	2	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	19	2	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	20	2	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	21	2	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	22	2	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	23	2	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	24	2	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	25	2	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	26	2	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	27	2	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	28	2	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	29	2	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	30	2	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	31	2	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	32	2	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	33	2	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	34	2	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	35	2	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	36	2	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	37	2	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	38	2	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	39	2	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
1	nov-12	nov-12	TP	40	2	<i>Kazachstania exigua</i>	k									
2	déc-12	déc-12	TP	1	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e	oui	oui							
2	déc-12	déc-12	TP	2	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	déc-12	déc-12	TP	3	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	déc-12	déc-12	TP	4	1	<i>Kazachstania exigua</i>	l	oui	oui				oui		oui	oui
2	déc-12	déc-12	TP	5	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	déc-12	déc-12	TP	6	1	<i>Kazachstania exigua</i>	l									
2	déc-12	déc-12	TP	7	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	déc-12	déc-12	TP	8	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	déc-12	déc-12	TP	9	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	déc-12	déc-12	TP	10	1	<i>Kazachstania exigua</i>	l									
2	déc-12	déc-12	TP	11	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	déc-12	déc-12	TP	12	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									

ID_boul	date_prel	date_isolt	point	ID_souche	rep_pate	espece	Alui	D1D2	ACT1	SD	Gly	SPO	MC	API	FACS	cell_size
2	déc-12	déc-12	TP	13	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e	oui	oui							
2	déc-12	déc-12	TP	14	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	déc-12	déc-12	TP	15	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	déc-12	déc-12	TP	16	1	<i>Kazachstania exigua</i>	l	oui	non							
2	déc-12	déc-12	TP	17	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	déc-12	déc-12	TP	18	1	<i>Kazachstania exigua</i>	l									
2	déc-12	déc-12	TP	19	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	déc-12	déc-12	TP	20	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	déc-12	déc-12	TP	21	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	déc-12	déc-12	TP	22	1	<i>Kazachstania exigua</i>	l									
2	déc-12	déc-12	TP	23	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	déc-12	déc-12	TP	24	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	déc-12	déc-12	TP	25	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	déc-12	déc-12	TP	26	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	déc-12	déc-12	TP	27	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	déc-12	déc-12	TP	28	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	déc-12	déc-12	TP	29	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	déc-12	déc-12	TP	30	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	déc-12	déc-12	TP	31	1	<i>Kazachstania exigua</i>	l									
2	déc-12	déc-12	TP	32	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	déc-12	déc-12	TP	33	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	déc-12	déc-12	TP	34	1	<i>Kazachstania exigua</i>	l									
2	déc-12	déc-12	TP	35	1	<i>Kazachstania exigua</i>	l									
2	déc-12	déc-12	TP	36	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	déc-12	déc-12	TP	37	1	<i>Kazachstania exigua</i>	l									
2	déc-12	déc-12	TP	38	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	déc-12	déc-12	TP	39	1	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	déc-12	déc-12	TP	40	1	<i>Kazachstania exigua</i>	l									
2	déc-12	déc-12	TP	1	2	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	déc-12	déc-12	TP	2	2	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	déc-12	déc-12	TP	3	2	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	déc-12	déc-12	TP	4	2	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	déc-12	déc-12	TP	5	2	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	déc-12	déc-12	TP	6	2	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	déc-12	déc-12	TP	7	2	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	déc-12	déc-12	TP	8	2	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	déc-12	déc-12	TP	9	2	<i>Kazachstania exigua</i>	l									
2	déc-12	déc-12	TP	10	2	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	déc-12	déc-12	TP	11	2	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	déc-12	déc-12	TP	12	2	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	déc-12	déc-12	TP	13	2	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	déc-12	déc-12	TP	14	2	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	déc-12	déc-12	TP	15	2	<i>Kazachstania exigua</i>	l									
2	déc-12	déc-12	TP	16	2	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	déc-12	déc-12	TP	17	2	<i>Kazachstania exigua</i>	l									
2	déc-12	déc-12	TP	18	2	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	déc-12	déc-12	TP	19	2	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	déc-12	déc-12	TP	20	2	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	déc-12	déc-12	TP	21	2	<i>Kazachstania unispora</i>	e									

ID_boul	date_prel	date_isolt	point	ID_souche	rep_pate	espece	Alui	D1D2	ACT1	SD	Gly	SPO	MC	API	FACS	cell_size
2	déc-12	déc-12	TP	22	2	<i>Kazachstania exigua</i>	l									
2	déc-12	déc-12	TP	23	2	<i>Kazachstania exigua</i>	l									
2	déc-12	déc-12	TP	24	2	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	déc-12	déc-12	TP	25	2	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	déc-12	déc-12	TP	26	2	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	déc-12	déc-12	TP	27	2	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	déc-12	déc-12	TP	28	2	<i>Kazachstania exigua</i>	l									
2	déc-12	déc-12	TP	29	2	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	déc-12	déc-12	TP	30	2	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	déc-12	déc-12	TP	31	2	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	déc-12	déc-12	TP	32	2	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	déc-12	déc-12	TP	33	2	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	déc-12	déc-12	TP	34	2	<i>Kazachstania exigua</i>	l									
2	déc-12	déc-12	TP	35	2	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	déc-12	déc-12	TP	36	2	<i>Kazachstania exigua</i>	l									
2	déc-12	déc-12	TP	37	2	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	déc-12	déc-12	TP	38	2	<i>Kazachstania exigua</i>	l									
2	déc-12	déc-12	TP	39	2	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
2	déc-12	déc-12	TP	40	2	<i>Kazachstania unispora</i>	e									
3	janv-13	janv-13	TP	1	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f	oui	oui						oui	
3	janv-13	janv-13	TP	2	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	3	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	4	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	5	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	6	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	7	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	8	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	9	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	10	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	11	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	12	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	13	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f	oui	oui							
3	janv-13	janv-13	TP	14	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	15	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	16	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	17	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	18	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	19	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	20	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	21	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	22	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	23	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	24	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	25	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	26	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	27	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	28	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	29	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	30	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									

ID_boul	date_prel	date_isolt	point	ID_souche	rep_pate	espece	Alui	D1D2	ACT1	SD	Gly	SPO	MC	API	FACS	cell_size
3	janv-13	janv-13	TP	31	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	32	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	33	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	34	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	35	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	36	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	37	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	38	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	39	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	40	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	1	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	2	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	3	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	4	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	5	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	6	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	7	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	8	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	9	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	10	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	11	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	12	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	13	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	14	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	15	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	16	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	17	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	18	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	19	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	20	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	21	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	22	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	23	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	24	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	25	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	26	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	27	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	28	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	29	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	30	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	31	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	32	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	33	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	34	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	35	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	36	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	37	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	38	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
3	janv-13	janv-13	TP	39	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									

ID_boul	date_prel	date_isolt	point	ID_souche	rep_pate	espece	Alui	D1D2	ACT1	SD	Gly	SPO	MC	API	FACS	cell_size
3	janv-13	janv-13	TP	40	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	f									
4	janv-13	janv-13	TP	1	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	m	oui	oui						oui	
4	janv-13	janv-13	TP	2	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	3	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	4	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	5	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	6	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	7	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	8	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	9	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	10	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	11	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	12	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	13	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	m	oui	oui							
4	janv-13	janv-13	TP	14	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	15	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	16	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	17	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	18	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	19	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	20	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	21	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	22	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	23	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	24	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	25	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	26	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	27	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	28	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	29	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	30	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	31	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	32	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	33	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	34	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	35	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	36	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	37	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	38	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	39	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	40	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	1	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	2	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	3	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	4	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	5	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	6	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	7	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	8	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									



ID_boul	date_prel	date_isolt	point	ID_souche	rep_pate	espece	Alui	D1D2	ACT1	SD	Gly	SPO	MC	API	FACS	cell_size
4	janv-13	janv-13	TP	9	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	10	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	11	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	12	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	13	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	14	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	15	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	16	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	17	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	18	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	19	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	20	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	21	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	22	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	23	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	24	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	25	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	26	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	27	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	28	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	29	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	30	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	31	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	32	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	33	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	34	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	35	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	36	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	37	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	38	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	39	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
4	janv-13	janv-13	TP	40	2	<i>Kazachstania bulderi</i>	m									
5	déc-12	déc-12	TP	1	1	<i>Candida humilis</i>	h	oui	oui							
5	déc-12	déc-12	TP	2	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	3	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	4	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	5	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	6	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	7	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	8	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	9	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	10	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	11	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	12	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	13	1	<i>Candida humilis</i>	h	oui	oui							
5	déc-12	déc-12	TP	14	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	15	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	16	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	17	1	<i>Candida humilis</i>	h									

ID_boul	date_prel	date_isolt	point	ID_souche	rep_pate	espece	Alui	D1D2	ACT1	SD	Gly	SPO	MC	API	FACS	cell_size
5	déc-12	déc-12	TP	18	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	19	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	20	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	21	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	22	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	23	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	24	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	25	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	26	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	27	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	28	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	29	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	30	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	31	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	32	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	33	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	34	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	35	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	36	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	37	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	38	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	39	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	40	1	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	1	2	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	2	2	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	3	2	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	4	2	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	5	2	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	6	2	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	7	2	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	8	2	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	9	2	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	10	2	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	11	2	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	12	2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	j	oui	oui	oui	oui	oui		oui	oui	oui
5	déc-12	déc-12	TP	13	2	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	14	2	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	15	2	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	16	2	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	17	2	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	18	2	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	19	2	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	20	2	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	21	2	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	22	2	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	23	2	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	24	2	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	25	2	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	26	2	<i>Candida humilis</i>	h									

ID_boul	date_prel	date_isolt	point	ID_souche	rep_pate	espece	Alui	D1D2	ACT1	SD	Gly	SPO	MC	API	FACS	cell_size
5	déc-12	déc-12	TP	27	2	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	28	2	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	29	2	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	30	2	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	31	2	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	32	2	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	33	2	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	34	2	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	35	2	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	36	2	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	37	2	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	38	2	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	39	2	<i>Candida humilis</i>	h									
5	déc-12	déc-12	TP	40	2	<i>Candida humilis</i>	h									
6	janv-13	janv-13	TP	1	1	<i>Candida humilis</i>	p									
6	janv-13	janv-13	TP	2	1	<i>Candida humilis</i>	p	oui	oui					oui	oui	
6	janv-13	janv-13	TP	3	1	<i>Candida humilis</i>	p	oui	oui							
6	janv-13	janv-13	TP	4	1	<i>Candida humilis</i>	p									
6	janv-13	janv-13	TP	5	1	<i>Candida humilis</i>	p									
6	janv-13	janv-13	TP	6	1	<i>Candida humilis</i>	p									
6	janv-13	janv-13	TP	7	1	<i>Candida humilis</i>	p									
6	janv-13	janv-13	TP	8	1	<i>Candida humilis</i>	p									
6	janv-13	janv-13	TP	9	1	<i>Candida humilis</i>	p									
6	janv-13	janv-13	TP	10	1	<i>Candida humilis</i>	p									
6	janv-13	janv-13	TP	11	1	<i>Candida humilis</i>	p									
6	janv-13	janv-13	TP	12	1	<i>Candida humilis</i>	p									
6	janv-13	janv-13	TP	13	1	<i>Candida humilis</i>	p									
6	janv-13	janv-13	TP	14	1	<i>Candida humilis</i>	p									
6	janv-13	janv-13	TP	15	1	<i>Candida humilis</i>	p									
6	janv-13	janv-13	TP	16	1	<i>Candida humilis</i>	p									
6	janv-13	janv-13	TP	17	1	<i>Candida humilis</i>	p									
6	janv-13	janv-13	TP	18	1	<i>Candida humilis</i>	p									
6	janv-13	janv-13	TP	19	1	<i>Candida humilis</i>	p									
6	janv-13	janv-13	TP	20	1	<i>Candida humilis</i>	p									
6	janv-13	janv-13	TP	21	1	<i>Candida humilis</i>	p									
6	janv-13	janv-13	TP	22	1	<i>Candida humilis</i>	p									
6	janv-13	janv-13	TP	23	1	<i>Candida humilis</i>	p									
6	janv-13	janv-13	TP	24	1	<i>Candida humilis</i>	p									
6	janv-13	janv-13	TP	25	1	<i>Candida humilis</i>	p									
6	janv-13	janv-13	TP	26	1	<i>Candida humilis</i>	p									
6	janv-13	janv-13	TP	27	1	<i>Candida humilis</i>	p									
6	janv-13	janv-13	TP	28	1	<i>Candida humilis</i>	p									
6	janv-13	janv-13	TP	29	1	<i>Candida humilis</i>	p									
6	janv-13	janv-13	TP	30	1	<i>Candida humilis</i>	p									
6	janv-13	janv-13	TP	31	1	<i>Candida humilis</i>	p									
6	janv-13	janv-13	TP	32	1	<i>Candida humilis</i>	p									
6	janv-13	janv-13	TP	33	1	<i>Candida humilis</i>	p									
6	janv-13	janv-13	TP	34	1	<i>Candida humilis</i>	p									
6	janv-13	janv-13	TP	35	1	<i>Candida humilis</i>	p									

ID_boul	date_prel	date_isolt	point	ID_souche	rep_pate	espece	Alui	D1D2	ACT1	SD	Gly	SPO	MC	API	FACS	cell_size
6	janv-13	janv-13	TP	36	1	<i>Candida humilis</i>	p									
6	janv-13	janv-13	TP	37	1	<i>Candida humilis</i>	p									
6	janv-13	janv-13	TP	38	1	<i>Candida humilis</i>	p									
6	janv-13	janv-13	TP	39	1	<i>Candida humilis</i>	p									
6	janv-13	janv-13	TP	40	1	<i>Candida humilis</i>	p									
7	janv-13	janv-13	TP	1	1	<i>Candida humilis</i>	n	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui
7	janv-13	janv-13	TP	2	1	<i>Candida humilis</i>	n	oui	oui							
7	janv-13	janv-13	TP	3	1	<i>Candida humilis</i>	n									
7	janv-13	janv-13	TP	4	1	<i>Candida humilis</i>	n									
7	janv-13	janv-13	TP	5	1	<i>Candida humilis</i>	n									
7	janv-13	janv-13	TP	6	1	<i>Candida humilis</i>	n									
7	janv-13	janv-13	TP	7	1	<i>Candida humilis</i>	n									
7	janv-13	janv-13	TP	8	1	<i>Candida humilis</i>	n									
7	janv-13	janv-13	TP	9	1	<i>Candida humilis</i>	n									
7	janv-13	janv-13	TP	10	1	<i>Candida humilis</i>	n									
7	janv-13	janv-13	TP	11	1	<i>Candida humilis</i>	n									
7	janv-13	janv-13	TP	12	1	<i>Candida humilis</i>	n									
7	janv-13	janv-13	TP	13	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	j	oui	oui	oui	oui	oui		oui	oui	oui
7	janv-13	janv-13	TP	14	1	<i>Candida humilis</i>	n									
7	janv-13	janv-13	TP	15	1	<i>Candida humilis</i>	n									
7	janv-13	janv-13	TP	16	1	<i>Candida humilis</i>	n									
7	janv-13	janv-13	TP	17	1	<i>Candida humilis</i>	n									
7	janv-13	janv-13	TP	18	1	<i>Candida humilis</i>	n									
7	janv-13	janv-13	TP	19	1	<i>Candida humilis</i>	n									
7	janv-13	janv-13	TP	20	1	<i>Candida humilis</i>	n									
7	janv-13	janv-13	TP	21	1	<i>Candida humilis</i>	n									
7	janv-13	janv-13	TP	22	1	<i>Candida humilis</i>	n									
7	janv-13	janv-13	TP	23	1	<i>Candida humilis</i>	n									
7	janv-13	janv-13	TP	24	1	<i>Candida humilis</i>	n									
7	janv-13	janv-13	TP	25	1	<i>Candida humilis</i>	n									
7	janv-13	janv-13	TP	26	1	<i>Candida humilis</i>	n									
7	janv-13	janv-13	TP	27	1	<i>Candida humilis</i>	n									
7	janv-13	janv-13	TP	28	1	<i>Candida humilis</i>	n									
7	janv-13	janv-13	TP	29	1	<i>Candida humilis</i>	n									
7	janv-13	janv-13	TP	30	1	<i>Candida humilis</i>	n									
7	janv-13	janv-13	TP	31	1	<i>Candida humilis</i>	n									
7	janv-13	janv-13	TP	32	1	<i>Candida humilis</i>	n									
7	janv-13	janv-13	TP	33	1	<i>Candida humilis</i>	n									
7	janv-13	janv-13	TP	34	1	<i>Candida humilis</i>	n									
7	janv-13	janv-13	TP	35	1	<i>Candida humilis</i>	n									
7	janv-13	janv-13	TP	36	1	<i>Candida humilis</i>	n									
7	janv-13	janv-13	TP	37	1	<i>Candida humilis</i>	n									
7	janv-13	janv-13	TP	38	1	<i>Candida humilis</i>	n									
7	janv-13	janv-13	TP	39	1	<i>Candida humilis</i>	n									
7	janv-13	janv-13	TP	40	1	<i>Candida humilis</i>	n									
8	janv-13	janv-13	TP	1	1	<i>Candida carpophila</i>	q	non	oui							
8	janv-13	janv-13	TP	2	1	<i>Candida humilis</i>	h									
8	janv-13	janv-13	TP	3	1	<i>Candida humilis</i>	h									
8	janv-13	janv-13	TP	4	1	<i>Candida humilis</i>	h									

ID_boul	date_prel	date_isolt	point	ID_souche	rep_pate	espece	Alui	DID2	ACT1	SD	Gly	SPO	MC	API	FACS	cell_size
8	janv-13	janv-13	TP	5	1	<i>Candida humilis</i>	h									
8	janv-13	janv-13	TP	6	1	<i>Candida humilis</i>	h									
8	janv-13	janv-13	TP	7	1	<i>Candida humilis</i>	h									
8	janv-13	janv-13	TP	8	1	<i>Candida humilis</i>	h									
8	janv-13	janv-13	TP	9	1	<i>Candida humilis</i>	h									
8	janv-13	janv-13	TP	10	1	<i>Candida humilis</i>	h	oui	oui	oui	oui	oui		oui	oui	oui
8	janv-13	janv-13	TP	11	1	<i>Candida humilis</i>	h									
8	janv-13	janv-13	TP	12	1	<i>Candida humilis</i>	h									
8	janv-13	janv-13	TP	13	1	<i>Candida humilis</i>	h									
8	janv-13	janv-13	TP	14	1	<i>Candida humilis</i>	h									
8	janv-13	janv-13	TP	15	1	<i>Candida humilis</i>	h									
8	janv-13	janv-13	TP	16	1	<i>Candida humilis</i>	h									
8	janv-13	janv-13	TP	17	1	<i>Candida humilis</i>	h									
8	janv-13	janv-13	TP	18	1	<i>Candida humilis</i>	h									
8	janv-13	janv-13	TP	19	1	<i>Candida humilis</i>	h									
8	janv-13	janv-13	TP	20	1	<i>Candida humilis</i>	h									
8	janv-13	janv-13	TP	21	1	<i>Candida humilis</i>	h									
8	janv-13	janv-13	TP	22	1	<i>Candida humilis</i>	h	oui	oui							
8	janv-13	janv-13	TP	23	1	<i>Candida humilis</i>	h									
8	janv-13	janv-13	TP	24	1	<i>Candida humilis</i>	h									
8	janv-13	janv-13	TP	25	1	<i>Candida humilis</i>	h									
8	janv-13	janv-13	TP	26	1	<i>Candida humilis</i>	h									
8	janv-13	janv-13	TP	27	1	<i>Candida humilis</i>	h									
8	janv-13	janv-13	TP	28	1	<i>Candida humilis</i>		oui	non							
8	janv-13	janv-13	TP	29	1	<i>Candida humilis</i>	h	oui	non							
8	janv-13	janv-13	TP	30	1	<i>Candida humilis</i>	h									
8	janv-13	janv-13	TP	31	1	<i>Candida humilis</i>	h									
8	janv-13	janv-13	TP	32	1	<i>Candida humilis</i>	h									
8	janv-13	janv-13	TP	33	1	<i>Candida humilis</i>	h									
8	janv-13	janv-13	TP	34	1	<i>Candida humilis</i>	h									
8	janv-13	janv-13	TP	35	1	<i>Candida humilis</i>	h									
8	janv-13	janv-13	TP	36	1	<i>Candida humilis</i>	h									
8	janv-13	janv-13	TP	37	1	<i>Candida humilis</i>	h									
8	janv-13	janv-13	TP	38	1	<i>Candida humilis</i>	h									
8	janv-13	janv-13	TP	39	1	<i>Candida humilis</i>	h									
8	janv-13	janv-13	TP	40	1	<i>Candida humilis</i>	h									
9	janv-13	janv-13	TP	1	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	r									
9	janv-13	janv-13	TP	2	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			oui							oui
9	janv-13	janv-13	TP	3	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	r	oui	oui							
9	janv-13	janv-13	TP	4	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	r	oui	oui							
9	janv-13	janv-13	TP	5	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	r									
9	janv-13	janv-13	TP	6	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	r									
9	janv-13	janv-13	TP	7	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	r									
9	janv-13	janv-13	TP	8	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	r									
9	janv-13	janv-13	TP	9	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	r									
9	janv-13	janv-13	TP	10	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	r									
9	janv-13	janv-13	TP	11	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	r									
9	janv-13	janv-13	TP	12	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	r									
9	janv-13	janv-13	TP	13	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	r									

ID_boul	date_prel	date_isolt	point	ID_souche	rep_pate	espece	Alui	DID2	ACT1	SD	Gly	SPO	MC	API	FACS	cell_size
9	janv-13	janv-13	TP	14	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	r									
9	janv-13	janv-13	TP	15	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	s	oui	oui							
9	janv-13	janv-13	TP	16	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	s	oui	oui							
9	janv-13	janv-13	TP	17	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	r									
9	janv-13	janv-13	TP	18	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	r									
9	janv-13	janv-13	TP	19	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	r									
9	janv-13	janv-13	TP	20	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	r									
9	janv-13	janv-13	TP	21	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	r									
9	janv-13	janv-13	TP	22	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	r									
9	janv-13	janv-13	TP	23	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	r									
9	janv-13	janv-13	TP	24	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	r									
9	janv-13	janv-13	TP	25	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	r									
9	janv-13	janv-13	TP	26	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	r									
9	janv-13	janv-13	TP	27	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	r									
9	janv-13	janv-13	TP	28	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	r									
9	janv-13	janv-13	TP	29	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	r									
9	janv-13	janv-13	TP	30	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	r									
9	janv-13	janv-13	TP	31	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	r									
9	janv-13	janv-13	TP	32	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	r									
9	janv-13	janv-13	TP	33	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	r									
9	janv-13	janv-13	TP	34	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	r									
9	janv-13	janv-13	TP	35	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	r									
9	janv-13	janv-13	TP	36	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	r									
9	janv-13	janv-13	TP	37	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	r									
9	janv-13	janv-13	TP	38	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	r									
9	janv-13	janv-13	TP	39	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	r									
9	janv-13	janv-13	TP	1	2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jj									
9	janv-13	janv-13	TP	2	2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jj									
9	janv-13	janv-13	TP	3	2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jj									
9	janv-13	janv-13	TP	4	2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jj									
9	janv-13	janv-13	TP	5	2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jj									
9	janv-13	janv-13	TP	6	2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jj									
9	janv-13	janv-13	TP	7	2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jj									
9	janv-13	janv-13	TP	8	2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jj									
9	janv-13	janv-13	TP	9	2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jj									
9	janv-13	janv-13	TP	10	2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jj									
9	janv-13	janv-13	TP	11	2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jj									
9	janv-13	janv-13	TP	12	2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jj									
9	janv-13	janv-13	TP	13	2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jj									
9	janv-13	janv-13	TP	14	2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jj									
9	janv-13	janv-13	TP	15	2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jj	oui	oui							
9	janv-13	janv-13	TP	16	2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jj									
9	janv-13	janv-13	TP	17	2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jj									
9	janv-13	janv-13	TP	18	2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jj									
9	janv-13	janv-13	TP	19	2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jj									
9	janv-13	janv-13	TP	20	2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jj									
9	janv-13	janv-13	TP	21	2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jj									
9	janv-13	janv-13	TP	22	2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jj									
9	janv-13	janv-13	TP	23	2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jj									

ID_boul	date_prel	date_isolt	point	ID_souche	rep_pate	espece	Alui	DID2	ACT1	SD	Gly	SPO	MC	API	FACS	cell_size
9	janv-13	janv-13	TP	24	2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jj									
9	janv-13	janv-13	TP	25	2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jj									
9	janv-13	janv-13	TP	26	2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jj									
9	janv-13	janv-13	TP	27	2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jj	oui	oui							
9	janv-13	janv-13	TP	28	2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jj									
9	janv-13	janv-13	TP	29	2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jj									
9	janv-13	janv-13	TP	30	2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jj									
9	janv-13	janv-13	TP	31	2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jj									
9	janv-13	janv-13	TP	32	2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jj									
9	janv-13	janv-13	TP	33	2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jj									
9	janv-13	janv-13	TP	34	2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jj									
9	janv-13	janv-13	TP	35	2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jj									
9	janv-13	janv-13	TP	36	2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jj									
9	janv-13	janv-13	TP	37	2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jj									
9	janv-13	janv-13	TP	38	2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jj									
9	janv-13	janv-13	TP	39	2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jj									
9	janv-13	janv-13	TP	40	2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jj									
10	janv-13	janv-13	TP	1	levain liqui	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jj									
10	janv-13	janv-13	TP	2	levain liqui	<i>Candida humilis</i>	hhhh									
10	janv-13	janv-13	TP	3	levain liqui	<i>Candida humilis</i>	hhhh									
10	janv-13	janv-13	TP	4	levain liqui	<i>Candida humilis</i>	hhhh									
10	janv-13	janv-13	TP	5	levain liqui	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jj									
10	janv-13	janv-13	TP	6	levain liqui	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jj									
10	janv-13	janv-13	TP	7	levain liqui	<i>Candida humilis</i>	hhhh									
10	janv-13	janv-13	TP	8	levain liqui	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jj	oui	oui					oui	oui	
10	janv-13	janv-13	TP	9	levain liqui	<i>Candida humilis</i>	hhhh									
10	janv-13	janv-13	TP	10	levain liqui	<i>Candida humilis</i>	hhhh									
10	janv-13	janv-13	TP	11	levain liqui	<i>Candida humilis</i>	hhhh									
10	janv-13	janv-13	TP	12	levain liqui	<i>Candida humilis</i>	hhhh									
10	janv-13	janv-13	TP	13	levain liqui	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jj									
10	janv-13	janv-13	TP	14	levain liqui	<i>Candida humilis</i>	hhhh									
10	janv-13	janv-13	TP	15	levain liqui	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jj									
10	janv-13	janv-13	TP	16	levain liqui	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jj									
10	janv-13	janv-13	TP	17	levain liqui	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jj									
10	janv-13	janv-13	TP	18	levain liqui	<i>Candida humilis</i>	hhhh									
10	janv-13	janv-13	TP	19	levain liqui	<i>Candida humilis</i>	hhhh									
10	janv-13	janv-13	TP	20	levain liqui	<i>Candida humilis</i>	hhhh									
10	janv-13	janv-13	TP	21	levain liqui	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jj	oui	oui							
10	janv-13	janv-13	TP	22	levain liqui	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jj									
10	janv-13	janv-13	TP	23	levain liqui	<i>Candida humilis</i>	hhhh									
10	janv-13	janv-13	TP	24	levain liqui	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jj									
10	janv-13	janv-13	TP	25	levain liqui	<i>Candida humilis</i>	hhhh									
10	janv-13	janv-13	TP	26	levain liqui	<i>Candida humilis</i>	hhhh									
10	janv-13	janv-13	TP	27	levain liqui	<i>Candida humilis</i>	hhhh									
10	janv-13	janv-13	TP	28	levain liqui	<i>Candida humilis</i>	hhhh									
10	janv-13	janv-13	TP	29	levain liqui	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jj									
10	janv-13	janv-13	TP	30	levain liqui	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jj									
10	janv-13	janv-13	TP	31	levain liqui	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jj									
10	janv-13	janv-13	TP	32	levain liqui	<i>Candida humilis</i>	hhhh	oui								

ID_boul	date_prel	date_isolt	point	ID_souche	rep_pate	espece	Alui	DID2	ACT1	SD	Gly	SPO	MC	API	FACS	cell_size
10	janv-13	janv-13	TP	33	levain liqui	<i>Candida humilis</i>	hhhh	oui	oui							
10	janv-13	janv-13	TP	34	levain liqui	<i>Candida humilis</i>	hhhh									
10	janv-13	janv-13	TP	35	levain liqui	<i>Candida humilis</i>	hhhh									
10	janv-13	janv-13	TP	36	levain liqui	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jj									
10	janv-13	janv-13	TP	37	levain liqui	<i>Candida humilis</i>	hhhh									
10	janv-13	janv-13	TP	38	levain liqui	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jj									
10	janv-13	janv-13	TP	39	levain liqui	<i>Candida humilis</i>	hhhh									
10	janv-13	janv-13	TP	40	levain liqui	<i>Candida humilis</i>	hhhh									
10	janv-13	janv-13	TP	1	levain ferm	<i>Candida humilis</i>	hhh								oui	oui
10	janv-13	janv-13	TP	2	levain ferm	<i>Candida humilis</i>	hhh									
10	janv-13	janv-13	TP	3	levain ferm	<i>Candida humilis</i>	hhh									
10	janv-13	janv-13	TP	4	levain ferm	<i>Candida humilis</i>	hhh									
10	janv-13	janv-13	TP	5	levain ferm	<i>Candida humilis</i>	hhh									
10	janv-13	janv-13	TP	6	levain ferm	<i>Candida humilis</i>	hhh									
10	janv-13	janv-13	TP	7	levain ferm	<i>Candida humilis</i>	hhh									
10	janv-13	janv-13	TP	8	levain ferm	<i>Candida humilis</i>	hhh	oui	oui							
10	janv-13	janv-13	TP	9	levain ferm	<i>Candida humilis</i>	hhh									
10	janv-13	janv-13	TP	10	levain ferm	<i>Candida humilis</i>	hhh									
10	janv-13	janv-13	TP	11	levain ferm	<i>Candida humilis</i>	hhh									
10	janv-13	janv-13	TP	12	levain ferm	<i>Candida humilis</i>	hhh									
10	janv-13	janv-13	TP	13	levain ferm	<i>Candida humilis</i>	hhh									
10	janv-13	janv-13	TP	14	levain ferm	<i>Candida humilis</i>	hhh									
10	janv-13	janv-13	TP	15	levain ferm	<i>Candida humilis</i>	hhh									
10	janv-13	janv-13	TP	16	levain ferm	<i>Candida humilis</i>	hhh									
10	janv-13	janv-13	TP	17	levain ferm	<i>Candida humilis</i>	hhh									
10	janv-13	janv-13	TP	18	levain ferm	<i>Candida humilis</i>	hhh									
10	janv-13	janv-13	TP	19	levain ferm	<i>Candida humilis</i>	hhh									
10	janv-13	janv-13	TP	20	levain ferm	<i>Candida humilis</i>	hhh	oui	non							
10	janv-13	janv-13	TP	21	levain ferm	<i>Candida humilis</i>	hhh									
10	janv-13	janv-13	TP	22	levain ferm	<i>Candida humilis</i>	hhh									
10	janv-13	janv-13	TP	23	levain ferm	<i>Candida humilis</i>	hhh									
10	janv-13	janv-13	TP	24	levain ferm	<i>Candida humilis</i>	hhh									
10	janv-13	janv-13	TP	25	levain ferm	<i>Candida humilis</i>	hhh									
10	janv-13	janv-13	TP	26	levain ferm	<i>Candida humilis</i>	hhh									
10	janv-13	janv-13	TP	27	levain ferm	<i>Candida humilis</i>	hhh									
10	janv-13	janv-13	TP	28	levain ferm	<i>Candida humilis</i>	hhh									
10	janv-13	janv-13	TP	29	levain ferm	<i>Candida humilis</i>	hhh									
10	janv-13	janv-13	TP	30	levain ferm	<i>Candida humilis</i>	hhh									
10	janv-13	janv-13	TP	31	levain ferm	<i>Candida humilis</i>	hhh									
10	janv-13	janv-13	TP	32	levain ferm	<i>Candida humilis</i>	hhh	oui	non							
10	janv-13	janv-13	TP	33	levain ferm	<i>Candida humilis</i>	hhh	oui	oui							
10	janv-13	janv-13	TP	34	levain ferm	<i>Candida humilis</i>	hhh									
10	janv-13	janv-13	TP	35	levain ferm	<i>Candida humilis</i>	hhh									
10	janv-13	janv-13	TP	36	levain ferm	<i>Candida humilis</i>	hhh									
10	janv-13	janv-13	TP	37	levain ferm	<i>Candida humilis</i>	hhh									
10	janv-13	janv-13	TP	38	levain ferm	<i>Candida humilis</i>	hhh									
10	janv-13	janv-13	TP	39	levain ferm	<i>Candida humilis</i>	hhh									
10	janv-13	janv-13	TP	40	levain ferm	<i>Candida humilis</i>	hhh									
11	janv-13	janv-13	TP	1	1	<i>Candida humilis</i>	hh	oui	oui							



ID_boul	date_prel	date_isolt	point	ID_souche	rep_pate	espece	Alui	D1D2	ACT1	SD	Gly	SPO	MC	API	FACS	cell_size
11	janv-13	janv-13	TP	2	1	<i>Candida humilis</i>	hh									
11	janv-13	janv-13	TP	3	1	<i>Candida humilis</i>	hh									
11	janv-13	janv-13	TP	4	1	<i>Candida humilis</i>	hh									
11	janv-13	janv-13	TP	5	1	<i>Candida humilis</i>	hh									
11	janv-13	janv-13	TP	6	1	<i>Candida humilis</i>	hh									
11	janv-13	janv-13	TP	7	1	<i>Candida humilis</i>	hh									
11	janv-13	janv-13	TP	8	1	<i>Candida humilis</i>	hh									
11	janv-13	janv-13	TP	9	1	<i>Candida humilis</i>	hh									
11	janv-13	janv-13	TP	10	1	<i>Candida humilis</i>	hh									
11	janv-13	janv-13	TP	11	1	<i>Candida humilis</i>	hh									
11	janv-13	janv-13	TP	12	1	<i>Candida humilis</i>	hh									
11	janv-13	janv-13	TP	13	1	<i>Candida humilis</i>	hh	oui	oui							
11	janv-13	janv-13	TP	14	1	<i>Candida humilis</i>	hh									
11	janv-13	janv-13	TP	15	1	<i>Candida humilis</i>	hh									
11	janv-13	janv-13	TP	16	1	<i>Candida humilis</i>	hh									
11	janv-13	janv-13	TP	17	1	<i>Candida humilis</i>	hh									
11	janv-13	janv-13	TP	18	1	<i>Candida humilis</i>	hh									
11	janv-13	janv-13	TP	19	1	<i>Candida humilis</i>	hh									
11	janv-13	janv-13	TP	20	1	<i>Candida humilis</i>	hh									
11	janv-13	janv-13	TP	21	1	<i>Candida humilis</i>	hh									
11	janv-13	janv-13	TP	22	1	<i>Candida humilis</i>	hh									
11	janv-13	janv-13	TP	23	1	<i>Candida humilis</i>	hh									
11	janv-13	janv-13	TP	24	1	<i>Candida humilis</i>	hh									
11	janv-13	janv-13	TP	25	1	<i>Candida humilis</i>	hh									
11	janv-13	janv-13	TP	26	1	<i>Candida humilis</i>	hh									
11	janv-13	janv-13	TP	27	1	<i>Candida humilis</i>	hh									
11	janv-13	janv-13	TP	28	1	<i>Candida humilis</i>	hh									
11	janv-13	janv-13	TP	29	1	<i>Candida humilis</i>	hh									
11	janv-13	janv-13	TP	30	1	<i>Candida humilis</i>	hh									
11	janv-13	janv-13	TP	31	1	<i>Candida humilis</i>	hh									
11	janv-13	janv-13	TP	32	1	<i>Candida humilis</i>	hh									
11	janv-13	janv-13	TP	33	1	<i>Candida humilis</i>	hh									
11	janv-13	janv-13	TP	34	1	<i>Candida humilis</i>	hh									
11	janv-13	janv-13	TP	35	1	<i>Candida humilis</i>	hh									
11	janv-13	janv-13	TP	36	1	<i>Candida humilis</i>	hh									
11	janv-13	janv-13	TP	37	1	<i>Candida humilis</i>	hh									
11	janv-13	janv-13	TP	38	1	<i>Candida humilis</i>	hh									
11	janv-13	janv-13	TP	39	1	<i>Candida humilis</i>	hh									
11	janv-13	janv-13	TP	40	1	<i>Candida humilis</i>	hh									
12	janv-13	janv-13	TP	1	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	o									
12	janv-13	janv-13	TP	2	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	o									
12	janv-13	janv-13	TP	3	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	o									
12	janv-13	janv-13	TP	4	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	o									
12	janv-13	janv-13	TP	5	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	o									
12	janv-13	janv-13	TP	6	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	o									
12	janv-13	janv-13	TP	7	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	o	oui	oui	oui	oui	oui		oui	oui	oui
12	janv-13	janv-13	TP	8	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	o									
12	janv-13	janv-13	TP	9	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	o									
12	janv-13	janv-13	TP	10	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	o									

ID_boul	date_prel	date_isolt	point	ID_souche	rep_pate	espece	Alui	D1D2	ACT1	SD	Gly	SPO	MC	API	FACS	cell_size
12	janv-13	janv-13	TP	11	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	o									
12	janv-13	janv-13	TP	12	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	o									
12	janv-13	janv-13	TP	13	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	o									
12	janv-13	janv-13	TP	14	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	o									
12	janv-13	janv-13	TP	15	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	o									
12	janv-13	janv-13	TP	16	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	o									
12	janv-13	janv-13	TP	17	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	o									
12	janv-13	janv-13	TP	18	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	o									
12	janv-13	janv-13	TP	19	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	o	oui	oui							
12	janv-13	janv-13	TP	20	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	o									
12	janv-13	janv-13	TP	21	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	o									
12	janv-13	janv-13	TP	22	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	o									
12	janv-13	janv-13	TP	23	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	o									
12	janv-13	janv-13	TP	24	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	o									
12	janv-13	janv-13	TP	25	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	o									
12	janv-13	janv-13	TP	26	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	o									
12	janv-13	janv-13	TP	27	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	o									
12	janv-13	janv-13	TP	28	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	o									
12	janv-13	janv-13	TP	29	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	o									
12	janv-13	janv-13	TP	30	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	o									
12	janv-13	janv-13	TP	31	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	o									
12	janv-13	janv-13	TP	32	1	NA	NA									
12	janv-13	janv-13	TP	33	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	o									
12	janv-13	janv-13	TP	34	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	o									
12	janv-13	janv-13	TP	35	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	o									
12	janv-13	janv-13	TP	36	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	o									
12	janv-13	janv-13	TP	37	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	o									
12	janv-13	janv-13	TP	38	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	o									
12	janv-13	janv-13	TP	39	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	o									
12	janv-13	janv-13	TP	40	1	<i>Kazachstania bulderi</i>	o									
13	janv-13	janv-13	TP	1	1	<i>Kazachstania barnettii</i>	v									
13	janv-13	janv-13	TP	2	1	<i>Kazachstania barnettii</i>	v									
13	janv-13	janv-13	TP	3	1	<i>Kazachstania barnettii</i>	v									
13	janv-13	janv-13	TP	4	1	<i>Kazachstania barnettii</i>	v									
13	janv-13	janv-13	TP	5	1	<i>Kazachstania barnettii</i>	v									
13	janv-13	janv-13	TP	6	1	<i>Kazachstania barnettii</i>	v	oui	oui			oui			oui	
13	janv-13	janv-13	TP	7	1	<i>Kazachstania barnettii</i>	v									
13	janv-13	janv-13	TP	8	1	<i>Kazachstania barnettii</i>	v									
13	janv-13	janv-13	TP	9	1	<i>Kazachstania barnettii</i>	v									
13	janv-13	janv-13	TP	10	1	<i>Kazachstania barnettii</i>	v									
13	janv-13	janv-13	TP	11	1	<i>Kazachstania barnettii</i>	v									
13	janv-13	janv-13	TP	12	1	<i>Kazachstania barnettii</i>	v									
13	janv-13	janv-13	TP	13	1	<i>Kazachstania barnettii</i>	v									
13	janv-13	janv-13	TP	14	1	<i>Kazachstania barnettii</i>	v									
13	janv-13	janv-13	TP	15	1	<i>Kazachstania barnettii</i>	v									
13	janv-13	janv-13	TP	16	1	<i>Kazachstania barnettii</i>	v									
13	janv-13	janv-13	TP	17	1	<i>Kazachstania barnettii</i>	v									
13	janv-13	janv-13	TP	18	1	<i>Kazachstania barnettii</i>	v	oui	oui							
13	janv-13	janv-13	TP	19	1	<i>Kazachstania barnettii</i>	v									

ID_boul	date_prel	date_isolt	point	ID_souche	rep_pate	espece	Alui	D1D2	ACT1	SD	Gly	SPO	MC	API	FACS	cell_size
13	janv-13	janv-13	TP	20	1	<i>Kazachstania barnettii</i>	v									
13	janv-13	janv-13	TP	21	1	<i>Kazachstania barnettii</i>	v									
13	janv-13	janv-13	TP	22	1	<i>Kazachstania barnettii</i>	v									
13	janv-13	janv-13	TP	23	1	<i>Kazachstania barnettii</i>	v									
13	janv-13	janv-13	TP	24	1	<i>Kazachstania barnettii</i>	v									
13	janv-13	janv-13	TP	25	1	<i>Kazachstania barnettii</i>	v									
13	janv-13	janv-13	TP	26	1	<i>Kazachstania barnettii</i>	v									
13	janv-13	janv-13	TP	27	1	<i>Kazachstania barnettii</i>	v									
13	janv-13	janv-13	TP	28	1	<i>Kazachstania barnettii</i>	v									
13	janv-13	janv-13	TP	29	1	<i>Kazachstania barnettii</i>	v									
13	janv-13	janv-13	TP	30	1	<i>Kazachstania barnettii</i>	v									
13	janv-13	janv-13	TP	31	1	<i>Kazachstania barnettii</i>	v									
13	janv-13	janv-13	TP	32	1	<i>Kazachstania barnettii</i>	v									
13	janv-13	janv-13	TP	33	1	<i>Kazachstania barnettii</i>	v									
13	janv-13	janv-13	TP	34	1	<i>Kazachstania barnettii</i>	v									
13	janv-13	janv-13	TP	35	1	<i>Kazachstania barnettii</i>	v									
13	janv-13	janv-13	TP	36	1	<i>Kazachstania barnettii</i>	v									
13	janv-13	janv-13	TP	37	1	<i>Kazachstania barnettii</i>	v									
13	janv-13	janv-13	TP	38	1	<i>Kazachstania barnettii</i>	v									
13	janv-13	janv-13	TP	39	1	<i>Kazachstania barnettii</i>	v									
13	janv-13	janv-13	TP	40	1	<i>Kazachstania barnettii</i>	v									
14	janv-13	janv-13	TP	1	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	r									
14	janv-13	janv-13	TP	2	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	r	oui	non							
14	janv-13	janv-13	TP	3	1	NA										
14	janv-13	janv-13	TP	4	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	r									
14	janv-13	janv-13	TP	5	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	r	oui	non							
14	janv-13	janv-13	TP	6	1	NA										
14	janv-13	janv-13	TP	7	1	NA										
14	janv-13	janv-13	TP	8	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	r	oui	non							
14	janv-13	janv-13	TP	9	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	t	oui	non							
14	janv-13	janv-13	TP	10	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	u	oui	oui					oui	oui	
14	janv-13	janv-13	TP	11	1	<i>Kazachstania barnettii</i>	s									
14	janv-13	janv-13	TP	12	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	u	oui	oui					oui		
14	janv-13	janv-13	TP	13	1	NA										
14	janv-13	janv-13	TP	14	1	NA										
14	janv-13	janv-13	TP	15	1	NA										
14	janv-13	janv-13	TP	16	1	NA										
14	janv-13	janv-13	TP	17	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	u	oui	oui							
14	janv-13	janv-13	TP	18	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	t	oui	non							
14	janv-13	janv-13	TP	19	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	t	oui	non							
14	janv-13	janv-13	TP	20	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	r									
14	janv-13	janv-13	TP	21	1	<i>Kazachstania barnettii</i>	s									
14	janv-13	janv-13	TP	22	1	<i>Kazachstania barnettii</i>	s	oui	non					oui		
14	janv-13	janv-13	TP	23	1	<i>Kazachstania barnettii</i>	s	oui	non							
14	janv-13	janv-13	TP	24	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	r									
14	janv-13	janv-13	TP	25	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	r									
14	janv-13	janv-13	TP	26	1	<i>Kazachstania barnettii</i>	v									
14	janv-13	janv-13	TP	27	1	NA										
14	janv-13	janv-13	TP	28	1	NA										

ID_boul	date_prel	date_isolt	point	ID_souche	rep_pate	espece	Alul	DID2	ACT1	SD	Gly	SPO	MC	API	FACS	cell_size
14	janv-13	janv-13	TP	29	1	NA										
14	janv-13	janv-13	TP	30	1	<i>Kazachstania barnettii</i>	s									
14	janv-13	janv-13	TP	31	1	<i>Kazachstania barnettii</i>	s									
14	janv-13	janv-13	TP	32	1	<i>Kazachstania barnettii</i>	s									
14	janv-13	janv-13	TP	33	1	<i>Kazachstania barnettii</i>	s	oui	non							
14	janv-13	janv-13	TP	34	1	<i>Kazachstania barnettii</i>	s	oui	oui							
14	janv-13	janv-13	TP	35	1	<i>Kazachstania barnettii</i>	s	oui	non							
14	janv-13	janv-13	TP	36	1	<i>Torulaspota delbrueckii</i>		oui	oui	oui	oui	oui		oui	oui	oui
14	janv-13	janv-13	TP	37	1	NA										
14	janv-13	janv-13	TP	38	1	NA										
14	janv-13	janv-13	TP	39	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	t									
14	janv-13	janv-13	TP	40	1	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	u									

## Résumé

Les microorganismes sont essentiels au maintien et au fonctionnement des écosystèmes. Dans certains produits alimentaires, la communauté microbienne, composée principalement de levures et de bactéries lactiques, fermente les sucres, affecte positivement les qualités organoleptiques du produit et augmente sa durée de conservation. C'est le cas du levain de panification. Cette thèse visait principalement à décrire les patrons de diversité des levures de levains français produits à partir de farine issue de l'Agriculture Biologique et à conserver une partie de cette diversité. Grâce à des méthodes d'analyses culturales et non culturales de la diversité des levures, nous avons mis en évidence une diversité spécifique caractéristique de chaque levain étudié. Nous avons aussi montré la dominance du genre *Kazachstania* et nos résultats suggèrent une convergence adaptative des souches isolées de levain pour l'assimilation du raffinose et du saccharose. Bien que la densité et la composition en espèces varient entre deux levains, aucune structuration spatiale de la diversité n'a été mise en évidence. Les pratiques de panification et leurs effets sur la diversité des communautés microbiennes ont également été analysés. Deux typologies de pratiques de panification (plutôt « intensive » et plutôt « extensive »), affectant l'espèce dominante des populations de levures, ont été mises en évidence.

**Mots clefs :** diversité spécifique, conservation de la biodiversité, communautés microbiennes, populations de levures, levain naturel, analyses culturales et non culturales, phénotypage, diversité des pratiques de panification

## Abstract

Microorganisms are essential for the maintenance and functioning of the ecosystems. In some food products, microbial community, mainly composed by yeasts and lactic acid bacteria which ferment sugars, positively affects organoleptic qualities and shelf life of the product. It is the case of bread sourdough. This PhD aimed at describing yeast diversity patterns of organic French bread sourdoughs and conserving a part of this diversity. Using cultural-based and non-cultural based analyses of yeast diversity, we highlighted a unique specific diversity of each sourdough. We also shown the predominance of *Kazachstania* genus and suggested an adaptive convergence of sourdoughs' yeasts isolates for the assimilation of raffinose and sucrose. Although density and species composition varied between sourdoughs, no spatial pattern was highlighted. Bread-making practices and their effects on microbial communities' diversity were also analyzed. Two bread-making practice typologies (quite « intensive » and quite « extensive »), affecting dominant yeast species were also revealed.

**Keywords:** specific diversity, biodiversity conservation, microbial communities, yeast populations, natural bread sourdough, cultural-based and non-cultural based analyses, phenotyping, bread-making practices diversity